



TITLE:

新規ブロモウイルス-シロイヌナズナ間相互作用の分子メカニズムの解明

AUTHOR(S):

三瀬, 和之

CITATION:

三瀬, 和之. 新規ブロモウイルス-シロイヌナズナ間相互作用の分子メカニズムの解明. 2003

ISSUE DATE:

2003-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/85061>

RIGHT:

新規ブロモウイルス-シロイヌナズナ間
相互作用の分子メカニズムの解明

(研究課題番号 13660049)

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成15年3月



研究代表者 三 瀬 和 之
(京都大学農学研究科助教授)

Brome mosaic virus (BMV) は、最も研究の進んだモデル植物ウイルスのひとつであるが、シロイヌナズナ等のモデル植物を宿主としない。最近我々は、BMV と同じプロモウイルス属に属し近縁な *Spring beauty latent virus* (SBLV) が、シロイヌナズナに効率よく全身感染することを発見した。13 年度の研究では、ウイルス-植物間相互作用に関わるウイルス因子を解析するために全長 cDNA を介した SBLV の遺伝子操作系を構築し、さらにゲノム RNA の構造を決定した。また、宿主植物因子のクローニングのためにシロイヌナズナのモデル accession を Col-0 に決定した。14 年度は、(1) EMS により突然変異誘起処理した Col-0 の種子由来の M2 植物 2,231 個体に SBLV を接種し調査した結果、SBLV 感染が遅延する変異株が 1 ライン選抜された。このラインにおける SBLV 感染の遅延は、細胞間移行のレベルで決定されていた。また、遺伝学的解析の結果、この遅延は劣性の形質によって支配されていた。(2) 67 種類のアクセッションにおける SBLV の感染性を調査した結果、Pla-0 では SBLV 感染が遅延した。この遅延は細胞間移行のレベルで決定されていた。また、遺伝学的解析の結果、この遅延は劣性あるいは不完全優性の形質によって支配されていた。(3) 85 種類のアクセッションにおける SBLV の病徴を観察した結果、S96 など 4 つのアクセッションが病徴を発現した。遺伝学的解析の結果、S96 における病徴発現に関与する不完全優性の核内単一遺伝子座 *SSB1* が同定された。さらにマッピング解析の結果、*SSB1* は第 4 染色体上に位置していた。S96 における SBLV の感染性を調査した結果、*SSB1* は SBLV の複製や細胞間移行、長距離移行といった感染過程には関与せず、病徴発現に関わっていた。

研究組織

研究代表者： 三瀬和之 (京都大学大学院農学研究科助教授)

研究経費

平成 13 年度	2,700 千円
平成 14 年度	800 千円
計	3,500 千円

研究発表

(1) 学会誌等

Damayanti, T. A., Mise, K., and Okuno, T. (2002) Analysis of nucleotide sequence and RNA tertiary structure required for BMV D-RNA packaging. 日植病報 68: 101 (講要)

Damayanti, T. A., Nagano, H., Mise, K., and Okuno, T. (2001) *Cis*-acting sequences essential for amplification and encapsidation of *Brome mosaic virus* (BMV) defective RNAs. 日植病報 67: 151 (講要)

Damayanti, T. A., Nagano, H., Mise, K., Furusawa, I. and Okuno, T. (2002). Positional effect of deletions on viability, especially on encapsidation, of *Brome mosaic virus* D-RNA in barley protoplasts. Virology 293(2): 314-319.

Dohi, K., Mise, K., Furusawa, I., and Okuno, T. (2002). RNA-dependent RNA polymerase complex of *Brome mosaic virus*: analysis of the molecular structure with monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. 83(11): 2879-2890.

Dohi, K., Mori, M., Furusawa, I., Mise, K., and Okuno, T. (2001). Brome mosaic virus replicase proteins localize with the movement protein at infection-specific cytoplasmic inclusions in infected barley leaf cells. Arch. Virol. 146(8): 1607-1615.

藤崎恒喜・萩原 文・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 (2002) シロイヌナズナを用いたプロモウイルスの感染機構の解析 (2) シロイヌナズナの 89 種のアクセッションに対する *Spring beauty latent virus* (SBLV) の感染性. 日植病報 68: 223 (講要)

藤崎恒喜・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 (2003) 植物トランジェント発現系を利用したプロモウイルス複製酵素の解析. 日植病報 69: 68 (講要)

Fujisaki, K., Hagihara, F., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. (2003). Complete nucleotide sequence of spring beauty latent virus, a bromovirus infectious to *Arabidopsis thaliana*. Arch. Virol. 148(1): 165-175.

Fujisaki, K., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. (2003). Use of *Spring beauty latent virus* to identify compatible interactions between bromovirus components required

for virus infection. J. Gen. Virol. 84(6): 1367-1375.

萩原 文・藤崎恒喜・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 (2002) シロイヌナズナを用いたブロモウイルスの感染機構の解析 (1) ブロモウイルスのシロイヌナズナに対する感染性決定因子の探索. 日植病報 68 : 222-223 (講要)

岩橋福松・藤崎恒喜・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 (2002) *Cassia yellow blotch virus* (CYBV) の遺伝子操作系の確立. 日植病報 68 : 102 (講要)

岩橋福松・藤崎恒喜・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 (2003) *Cassia yellow blotch virus* (CYBV) の感染性 cDNA クロンの全塩基配列の決定および他のブロモウイルスとのゲノム交換変異体を用いた解析. 日植病報 69 : 68 (講要)

Iwamoto, T., Mise K., Mori, K., Arimoto, M., Nakai, T., and Okuno, T. (2001). Establishment of an infectious RNA transcription system for *Striped jack nervous necrosis virus*, the type species of the betanodaviruses. J. Gen. Virol. 82(11): 2653-2662.

Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K., Arimoto, M., Mise, K., and Furusawa, I. (2001). Transfection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) RNA into fish cells. Journal of Fish Diseases 24: 185-188.

水本裕之・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 (2002) *Red clover necrotic mosaic virus* カナダ株 (RCNMV-Can) RNA1 の 3' 末端に存在する stem-loop 構造は RCNMV-Can の温度感受性に関与する. 日植病報 68 : 221-222 (講要)

Mori, M., Fujihara, N., Mise, K., and Furusawa, I. (2001). Inducible high-level mRNA amplification system by viral replicase in transgenic plants. Plant J. 27(1): 79-88.

永野秀昭・竹田篤史・三瀬和之・奥野哲郎 (2001) 自己切断型 GFP 融合タンパク質遺伝子を用いたキュウリモザイクウイルスの細胞間移行の可視化. 日植病報 67 : 148 (講要)

Nagano, H., Mise, K., Furusawa, I., and Okuno, T. (2001). Conversion in the requirement of coat protein in cell-to-cell movement mediated by the cucumber mosaic virus movement protein. J. Virol. 75(17): 8045-8053.

中村和香子・佐々木信光・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 (2002) *Brome mosaic*

virus (BMV) の移行タンパク質の C 端領域は細胞間移行における外被タンパク質(CP)要求性に関与している. 日植病報 68 : 102 (講要)

Okinaka, Y., Mise, K., Okuno, T., and Furusawa, I. (2003). Characterization of a novel barley protein, HCP1, that interacts with the *Brome mosaic virus* coat protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16(4): 352-359.

Okinaka Y., Mise, K., Suzuki, E., Okuno, T., and Furusawa, I. (2001). The C terminus of Brome mosaic virus coat protein controls viral cell-to-cell and long-distance movement. *J. Virol.* 75(11): 5385-5390.

奥西 佳・松本耕平・土肥浩二・三瀬和之・奥野哲郎 (2002) トバモウウイルスの宿主特異性: PMMoV と ToMV の複製酵素遺伝子キメラウイルスの解析. 日植病報 68 : 101 (講要)

佐々木信光・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 (2002) 組み換えプロモウイルスの非宿主への適応に必要なコドン変異の偏りの発生機構. 日植病報 68 : 222 (講要)

Sasaki, N., Arimoto, M., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. (2003). The movement protein gene is involved in the virus-specific requirement of the coat protein in cell-to-cell movement of bromoviruses. *Arch. Virol.* 148(4): 803-812.

Sasaki, N., Fujita, Y., Mise, K., and Furusawa, I. (2001). Site-specific single amino acid changes to Lys or Arg in the central region of the movement protein of a hybrid bromovirus are required for adaptation to a nonhost. *Virology* 279(1): 47-57.

杉山量彦・海道真典・三瀬和之・石川雅之・奥野哲郎 (2002) VIGS による宿主植物遺伝子の発現制御はウイルス感染による病徴発現を遅延する. 日植病報 68 : 216 (講要)

鈴木絵理・三瀬和之・海道真典・奥野哲郎 (2001) GFP を利用した *Brome mosaic virus* (BMV) 外被タンパク質の C 末端領域の役割解明—粒子化の解析と *Chenopodium quinoa* における感染性. 日植病報 67 : 150-151 (講要)

竹田篤史・三瀬和之・海道真典・奥野哲郎 (2001) GFP を利用した *Brome mosaic virus* (BMV) 3a タンパク質アラニン置換変異体の細胞間移行に関する研究.

日植病報 67 : 150 (講要)

竹田篤史・三瀬和之・海道真典・奥野哲郎 (2002) *Brome mosaic virus* (BMV)は細胞間移行に粒子化を必要としない. 日植病報 68 : 222 (講要)

Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., and Okuno, T. (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. FEBS Lett. 532(1-2): 75-79.

武田芳佳・海道真典・井上陽介・三瀬和之・奥野哲郎 (2001) *Brome mosaic virus* (BMV)移行タンパク質と相互作用する *Nicotiana benthamiana* 因子の Far-western スクリーニング. 日植病報 67 : 150 (講要)

玉井淳史・久保田健嗣・永野秀昭・三瀬和之・飯 哲夫 (2002) *Cucumber mosaic virus* (CMV)の移行機能による *Tomato mosaic virus* (ToMV)の細胞間移行の解析. 日植病報 68 : 226 (講要)

立田昌宏・水本裕之・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 (2002) *Red clover necrotic mosaic virus* RNA2 の複製に必要なシス配列の解析. 日植病報 68 : 222 (講要)

立田昌宏・水本裕之・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 (2003) *Red clover necrotic mosaic virus* RNA2 の複製に必要なシス配列の解析. 日植病報 69 : 67 (講要)

(2) 口頭発表

Damayanti, T. A., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T.

Cis-acting sequences required for efficient packaging of *Brome mosaic virus* RNA3 *in vivo*.

12th International Congress of Virology. July 27—August 1, 2002, Paris, France.

Fujisaki, K., Mise, K., Kaido, M., and Okuno, T.

Spring beauty latent virus RNA2 supports viral RNA replication in combination with RNA1 of related bromoviruses.

10th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions. July 10—14, 2001, Madison, Wisconsin, USA.

Hagihara, F., Fujisaki, K., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T.

Resistance to *Spring beauty latent virus* (SBLV) cell-to-cell movement in *Arabidopsis thaliana*.

12th International Congress of Virology. July 27—August 1, 2002, Paris, France.

Iwamoto, T., Mise K., Mori, K., Arimoto, M., Nakai, T., and Okuno, T.

Establishment of an infectious RNA transcription system for *Striped jack nervous necrosis virus*, the type species of betanodaviruses.

20th Annual Meeting of American Society for Virology, July 21—25, 2001, Madison, Wisconsin, USA.

Matsumoto, K., Takayama, Y., Hikichi, Y., Mise, K., and Okuno, T.

Interaction of movement protein and coat protein controls long-distance movement of tobamoviruses in a host specific manner.

10th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions. July 10—14, 2001, Madison, Wisconsin, USA.

Mise, K.

Identification of plant proteins that interact with movement-associated proteins of *Brome mosaic virus*.

1st International Symposium on Plant Virus-Host Interactions. Feb. 22, 2002, Tokyo, Japan.

水本裕之・立田昌宏・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎

Cap 構造と poly(A) に依存しない *Red clover necrotic mosaic virus* の翻訳機構。

第 50 回日本ウイルス学会学術集会 (2002 年 10 月 16 日～18 日) 講要 : 329

Mizumoto, H., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T.

Cap-independent and temperature sensitive translational enhancement by the 5' - and the 3'-UTR of *Red clover necrotic mosaic virus* Canadian strain RNA1.

12th International Congress of Virology. July 27—August 1, 2002, Paris, France.

Nakamura, W., Sasaki, N., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T.

The C-terminal region of *Brome mosaic virus* movement protein is involved in the requirement of coat protein in cell-to-cell movement and indispensable for systemic infection.

12th International Congress of Virology. July 27—August 1, 2002, Paris, France.

Okinaka, Y., Mise, K., Okuno, T. and Furusawa, I.
Brome mosaic virus infection requires direct interaction of the coat protein with a novel barley protein, HCP1.

12th International Congress of Virology. July 27—August 1, 2002, Paris, France.

Takeda, A., Mise, K., Kaido, M., and Okuno, T.
Okinaka, Y., Mise, K., Suzuki, E., Okuno, T., and Furusawa, I.
The C-terminus of *Brome mosaic virus* coat protein controls viral cell-to-cell and long-distance movement.

10th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions. July 10—14, 2001, Madison, Wisconsin, USA.

奥野哲郎・ダマヤンティ-トリ-アスミラ・海道真典・三瀬和之

ブロムモザイクウイルス RNA3 の in vivo での粒子化に必要な RNA 配列と 2 次構造.

第 50 回日本ウイルス学会学術集会 (2002 年 10 月 16 日～18 日) 講要 : 331

佐々木信光・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎

組み換え植物 RNA ウイルスの非宿主への適応に必要とされるコドン変異の偏りの発生機構の解析.

第 50 回日本ウイルス学会学術集会 (2002 年 10 月 16 日～18 日) 講要 : 333

Sasaki, N., Arimoto, M., Nagano, H., Mise, K., and Okuno, T.

The movement protein genes of *Bromovirus* determine the involvement of the coat protein genes in initial cell-to-cell movement in plants.

10th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions. July 10—14, 2001, Madison, Wisconsin, USA.

Sasaki, N., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T.

Potential mechanisms of biased codon changes necessary for adaptation of a hybrid bromovirus to a nonhost.

12th International Congress of Virology. July 27—August 1, 2002, Paris, France.

Sasaki, N., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T.

Single amino acid changes in the central region of *Brome mosaic virus* movement protein alter the requirement for coat protein in viral initial cell-to-cell movement.

12th International Congress of Virology. July 27—August 1, 2002, Paris, France.

竹田篤史・杉山量彦・永野秀昭・海道真典・三瀬和之・津田新哉・奥野哲郎

トマト黄化えそウイルスの NSs タンパク質は RNA サイレンシングを抑制する.

第 25 回日本分子生物学会年会 (2002 年 12 月 11 日~14 日) 講要: 2P-0290

Takeda, A., Mise, K., Kaido, M., and Okuno, T.

Is virion formation required for cell-to-cell movement of *Brome mosaic virus*?

12th International Congress of Virology. July 27—August 1, 2002, Paris, France.

玉井淳史・久保田健嗣・永野秀昭・三瀬和之・吉井基泰・石川雅之・飯 哲夫
ククモウイルス及びブロモウイルスの移行機能における CP 要求性.

第 25 回日本分子生物学会年会 (2002 年 12 月 11 日~14 日) 講要: 1P-0360

(3) 出版物

三瀬和之・冲中 泰. (2002). 植物ウイルス外被タンパク質の多機能性 -ゲノム
核酸の保護だけでなく, 細胞間移行, 長距離移行など感染の様々なステッ
プに関わることが明らかに. 化学と生物 40 (6): 354-356.

Nagano, H., Mise, K., Furusawa, I., and Okuno, T. (2002). Plant virus cell-to-cell
movement mediated by the cucumber mosaic virus movement protein. Recent Res.
Devel. Virol. 4: 99-105.

引用文献

摘 要

第1部

新規ブロモウイルス-シロイヌナズナ間 相互作用の分子メカニズムの解明

第1部 シロイヌナズナに感染する新規ブロモウイルスの 遺伝子操作系の確立

第1章 Complete nucleotide sequence of spring beauty latent virus, a bromovirus infectious to *Arabidopsis thaliana*

Complete nucleotide sequence of spring beauty latent virus,
a bromovirus infectious to *Arabidopsis thaliana*

第2部 シロイヌナズナを用いた新規ブロモウイルスの 感染に関与する宿主植物因子の探索

序 論 Fujisaki, F. Hagihara, M. Kaido, K. Mitsu, and T. Osumi

第1章 *Spring beauty latent virus* の感染に影響を与える シロイヌナズナ変異体の選抜

第2章 *Spring beauty latent virus* の細胞間移行が遅延する シロイヌナズナのアクセション Pla-0 の同定

Author for correspondence: T. Osumi, Department of Plant
Pathology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan.

第3章 *Spring beauty latent virus* の病徴発現に関与する シロイヌナズナの遺伝子座 SSB1 の同定

Note: sequence data reported are available in the DDBJ/EMBL/GenBank
databases under the accession numbers AB080596, AB080599 and AB080601.

摘 要

Running title: SBLV infection and host-plant sequence

第 1 部

シロイヌナズナに感染する新規ブロモウイルス の遺伝子操作系の確立

第 1 章

Complete nucleotide sequence of spring beauty latent virus, a bromovirus infectious to *Arabidopsis thaliana*

Brief report

K. Fujisaki, F. Hagihara, M. Kaido, K. Mise, and T. Okuno

Laboratory of Plant Pathology, Graduate School of Agriculture,
Kyoto University, Kyoto, Japan

Author for correspondence: Kazuyuki Mise. Postal address: Laboratory of Plant Pathology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan. Telephone: +81-75-753-6132. Fax: +81-75-753-6131. E-mail: kmise@kais.kyoto-u.ac.jp

Note: Nucleotide sequence data reported are available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under the accession numbers AB080598, AB080599 and AB080600.

Running title: SBLV infectivity and nucleotide sequence

Summary

Spring beauty latent virus (SBLV), a bromovirus, systemically and efficiently infected *Arabidopsis thaliana*, whereas the well-studied bromoviruses brome mosaic virus (BMV) and cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) did not infect and poorly infected *A. thaliana*, respectively. We constructed biologically active cDNA clones of SBLV genomic RNAs and determined their complete nucleotide sequences. Interestingly, SBLV RNA3 contains both the box B motif in the intergenic region, as does BMV, and the subgenomic promoter-like sequence in the 5' noncoding region, as does CCMV. Sequence comparisons of SBLV, BMV, CCMV, and broad bean mottle virus demonstrated that SBLV is closely related to BMV and CCMV.

Main text

Systemic infection by plant viruses is established *via* multiple steps. At each step, several viral and host factors are involved in virus multiplication. To elucidate the mechanism of viral infections of plants, many viral factors have been examined, but host factors have not been identified in sufficient detail. The complete genome of *Arabidopsis thaliana* has been sequenced [8, 9], and this plant species has been used as a model in many studies including the analysis of plant-microbe interactions [14, 15].

Bromoviruses are icosahedral plant viruses, the genomes of which are positive-sense tripartite RNA molecules designated RNA1, RNA2, and RNA3 [25]. Each RNA has a cap structure and a tRNA-like structure at the 5' and 3' termini, respectively, and the intergenic region (ICR) in RNA3 contains a poly(A) tract. RNAs 1 and 2 encode the 1a and 2a proteins, respectively, which are involved in viral genome replication [20, 21]. RNA3 is not essential for viral RNA replication, but encodes the 3a protein required for viral movement [27, 28, 42] and the coat protein (CP), which is translated from a subgenomic RNA designated RNA4 [39]. Six viruses belong to the genus *Bromovirus* in the family *Bromoviridae*: *Brome mosaic virus* (BMV), *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV), *Broad bean mottle virus* (BBMV), *Spring beauty latent virus* (SBLV), *Cassia yellow blotch virus*, and *Melandrium yellow fleck virus* (MYFV) [38]. Full-length cDNA clones have already been constructed for BMV, CCMV, and BBMV, from which infectious transcripts have been generated *in vitro* [4, 5, 33], and the complete genomic sequences of these viruses have been determined [2, 3, 6, 13, 37]. The bromoviruses are some of the best characterized plant viruses in which the viral factors required for infection have been analysed. However, only a few of the host factors required for systemic bromoviral infections have been identified [10, 26, 29, 36]. One reason for the delay in identifying these host factors, especially those involved in viral cell-to-cell and long-distance movement in plants, is that no bromovirus has been identified that infects *A. thaliana*.

SBLV was isolated from *Craytonia virginica* (Portulacaceae) in north-west Arkansas, USA, and is serologically related to BMV and CCMV, but not to BBMV or MYFV. However, SBLV virions are icosahedral particles approximately 28 nm in diameter, larger than those of BMV and CCMV; they are stable at neutral pH, whereas BMV and CCMV virions are stable at low pH. Furthermore, the host range of SBLV is different from those of BMV and CCMV. Therefore, SBLV is considered to be an unusual bromovirus, with properties that differ from those of other bromoviruses [45, 46].

In this study, we demonstrated that SBLV systemically and efficiently infects *A. thaliana*. Then, to establish a model system to elucidate bromovirus-plant interactions, we constructed biologically active cDNA clones of SBLV genomic RNAs and determined the complete nucleotide sequences of these RNAs.

Gomphrena globosa plants were inoculated with SBLV (American Type Culture Collection [ATCC] PV-369), and virions were purified as described previously [45]. Virions of BMV and CCMV were purified as described previously [31] from barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Hinodehadaka) and cowpea (*Vigna unguiculata* cv. California Blackeye) plants inoculated with *in vitro* transcripts of BMV M1 strain [4] and CCMV M1 strain [5], respectively. Viral RNAs were isolated from purified virions using an RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Chatsworth, CA). *Arabidopsis thaliana* accession Columbia-0 (Col-0) plants were grown essentially as described previously [17, 48]. *Nicotiana benthamiana*, *G. globosa*, *Chenopodium quinoa*, pea (*Pisum sativum* cv. Midori-usui), cowpea, and barley were grown as described previously [41].

The fully expanded rosette leaves of the model plant *A. thaliana* Col-0 were inoculated 3–4 weeks after sowing, with virion RNAs of BMV, CCMV, or SBLV. The accumulation of viral CPs in inoculated rosette leaves and uninoculated upper cauline leaves was assessed at 14 days post-inoculation (dpi) by western blot analysis [7]. Because anti-BMV antiserum (ATCC PVAS-178) cross-reacts strongly with CCMV CP and to some degree with SBLV CP (Fig. 1A), anti-BMV antiserum was used to detect bromovirus CPs. The infectivity of each virus was evaluated in at least three independent infection experiments with consistent results. SBLV CP accumulated to high levels in both the inoculated and uninoculated leaves (Fig. 1B, lanes 9–12). BMV CP was not detected, even in the inoculated leaves (Fig. 1B, lanes 1–4), despite its strong reactivity with anti-BMV antiserum (Fig. 1A). The accumulation of CCMV CP in the inoculated leaves (Fig. 1B, lanes 5, 7) was sevenfold less than that of SBLV CP, which was estimated after normalizing the difference in immuno-reactivity (Fig. 1A). CCMV CP was usually undetected in the uninoculated cauline leaves (Fig. 1B, lane 6), except in 20% of the inoculated plants (Fig. 1B, lane 8), and its accumulation was 40-fold less than that of SBLV CP. Although SBLV systemically infected Col-0 plants, no symptoms were observed, as was also the case with BMV and CCMV infections. These

results demonstrate that, of the three bromoviruses, SBLV infected Col-0 plants most efficiently, and suggest that SBLV may be useful in the identification of the host factors involved in the systemic infection of plants by bromoviruses.

The host range of SBLV was checked in several plant species that have been used for laboratory experiments with bromoviruses. The two largest leaves of *N. benthamiana*, *G. globosa*, and *C. quinoa* were inoculated four weeks after sowing, and the primary leaves of cowpea, pea, and barley were inoculated one week after sowing. SBLV virion RNAs showed infectivity and induced symptoms in *G. globosa*, *C. quinoa*, cowpea, and pea, as described previously [45] (Table 1). Furthermore, SBLV systemically infected *N. benthamiana*, which is a common systemic host for BMV and CCMV, and induced systemic mild mottle symptoms, although BMV and CCMV infected *N. benthamiana* asymptotically. Moreover, SBLV did not infect barley, which is a selective host for BMV. These results indicate that SBLV is closer to CCMV than to BMV in terms of host range (Table 1).

To isolate partial cDNA fragments corresponding to the 5' and 3' proximal regions of the 1a and 2a open reading frames (ORFs) of SBLV, we performed RT-PCR using four sets of degenerate primers, which were designed based on the amino acid sequences conserved among the replication proteins of BMV, CCMV, and BBMV. The conserved amino acid sequences are AEHYDC plus MFDGAM and FGDTEQ plus KCDFLFK for 1a, and VPSFQW plus HAYFDD and CDRMKF plus (D/E)WFH(D/N)W for 2a. Amplified cDNAs were directly cloned into pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI). Because the 3' ends of the genomic RNAs of known bromoviruses terminate with CCA, SBLV RNA3 was polyadenylated using poly(A) polymerase (Takara, Otsu, Japan) and reverse transcribed using a T₁₆G primer. Second strands were then synthesized, and the fragments cloned as described previously [18]. The cDNA inserts from genomic RNAs 1, 2, and 3 were sequenced using an automated DNA sequencer (model 310, Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers were designed on the basis of these sequences, and the terminal sequences of SBLV RNAs were determined by rapid amplification of cDNA ends (RACE) [16].

Full-length cDNAs of the SBLV RNAs were synthesized by RT-PCR under the conditions specified for SuperScript II reverse transcriptase (Life Technologies, Gaithersburg, MD) and LA *Taq* DNA polymerase (Takara), using primers designed to both terminal sequences of the SBLV RNAs determined by RACE. The primers contained a *Pst*I site for cloning, and an *Mlu*I site for linearization of the plasmid DNA clones (Fig. 2). To enhance the efficiency of transcription, an extra G residue was added between the T7 promoter sequence and the 5' terminus of SBLV genomes (Fig. 2). The addition of a single extra 5' G residue does not have any detrimental effect on infection with BMV transcripts [19]. Amplified DNAs were cut with *Pst*I and ligated into *Pst*I-cut

pUC118 (Takara).

Of the capped transcripts from full-length cDNA clones of SBLV genomes, one clone each of RNAs 1 and 2, and five clones of RNA3 were involved in the production of SBLV-specific necrotic symptoms in *G. globosa* as severe as those induced by SBLV virion RNAs (data not shown). To further select between the five RNA3 clones, we determined the length of the poly(A) tracts in the ICR of SBLV RNA3, because the lengths are heterogeneous in each population of BMV, CCMV, and BBMV [37] (Fig. 3). The poly(A) sequences of the five clones were 34–42 residues long, with an average of 39 residues. We chose one infectious RNA3 cDNA clone with a 41-residue poly(A) sequence, because it was closest to the average length in the virus population. These representative cDNA clones of SBLV RNAs 1, 2, and 3 were designated pSB1TP6, pSB2TP7, and pSB3TP9, respectively, and this set of plasmids and all *in vitro* and *in vivo* products arising from them are referred to as belonging to the KU1 strain of SBLV. The infectivity of a mixture of capped transcripts synthesized from these clones [22] and the symptoms caused by their infections in several plant species were identical to those produced by SBLV virion RNAs (Table 1, data not shown), indicating that the KU1 strain of SBLV reflects the characteristics of the ATCC PV-369 strain of SBLV.

The complete nucleotide sequences of SBLV RNAs 1, 2, and 3 were determined by sequencing the full-length cDNA inserts of pSB1TP6, pSB2TP7, and pSB3TP9, respectively. To determine the nucleotide sequences, we first used the EZ::TN™ <KAN-1> Insertion Kit (Epicentre, Madison, WI). Sequencing was completed using terminal deletion clones and appropriate synthetic primers. The nucleotide and amino acid sequence data were analysed using DNASIS-Mac v. 3.6 software (Hitachi, Japan) and the CLUSTAL W program [44], respectively. All cDNAs were found to be inserted in the direction opposite to that of the *lacZ* gene in the cloning plasmid. The lengths of SBLV RNAs 1, 2, and 3 were 3,252, 2,898, and 2,213 nucleotides, respectively. By sequencing RACE products, we determined that the 5'-terminal residues of SBLV RNAs 1, 2, and 3 were guanine, consistent with BMV [2, 3] and CCMV [6, 13], whereas those of BBMV are commonly adenine [13, 37] (Fig. 3).

The 5' noncoding regions of SBLV RNAs 1 and 2 contain two motifs highly conserved among the other bromoviruses (Fig. 3). These correspond to canonical boxes A and B in the eukaryotic RNA polymerase III promoter (Fig. 3), which is considered to be an internal control region for the replication of viral genomic RNAs [34, 35]. By contrast, SBLV RNA3 does not contain the definite sequences of boxes A and B in the 5' noncoding sequence, but contains the box B motif in its ICR region (Fig. 3). This is not a common characteristic for bromoviruses. Of BMV, CCMV, and BBMV, only BMV has this motif in the ICR region (Fig. 3), and the box B motif in the ICR of BMV RNA3 is required for the 1a protein-mediated stabilization of RNA3 [43]. There is another

characteristic of noncoding sequences that differs between bromoviruses: a large segment, which matches to the bromoviral subgenomic promoter core regions of the RNA3 ICR, exists in the 5' noncoding sequences of RNA3s of CCMV and BBMV but not of BMV [6, 37] (Fig. 3). SBLV RNA3 also contains a subgenomic promoter-like sequence in the 5'-terminal noncoding region of RNA3 (Fig. 3). Because no subgenomic RNAs have yet been identified that express 3a protein, the protein is probably translated directly from RNA3. No significant biological function has been identified for this insertional segment in RNA3, except for some contribution to viral competitiveness [32]. Therefore, it has been suggested that this sequence may be a relic from a precursor virus, when a three-component bromovirus evolved from a single-component ancestral virus, such as tobacco mosaic virus [6].

The 3' ends of SBLV RNAs terminate with CCA, and the 3'-terminal regions are predicted to form tRNA-like structures, which are common at the 3' ends of bromovirus RNAs [1]. Moreover, all the tRNA-like structures of SBLV RNAs are predicted to be charged with tyrosine because they have an anti-codon loop for tyrosine and contain a D-arm, as do those of BMV and CCMV but not BBMV [1] (Fig. 3). Although the tRNA-like structures of SBLV RNAs 1, 2, and 3 are similar to each other and to those of BMV and CCMV, the sequence similarities between the 3'-terminal 150-nucleotide regions forming the tRNA-like structures of the three genomic RNAs were low (60.0–83.3%) in SBLV compared with those in BMV (94.6–98.0%) and CCMV (86.6–90.6%). The extensive differences in the 3' 150-nucleotide sequences between the SBLV RNAs may have considerable effect on the accumulation ratio of individual RNA components at the single-cell level, as reported for BMV [12].

Four potential ORFs were identified in the genomic RNA sequences of SBLV, as well as in those of BMV, CCMV, and BBMV. SBLV RNAs 1 and 2 each contain one large ORF, corresponding to the 1a and 2a genes of other bromoviruses, respectively. SBLV RNA3 contains two ORFs corresponding to the 3a and CP genes of other bromoviruses. Bromovirus CP is involved in virion formation and viral long-distance movement. Our preliminary data demonstrate that SBLV CP is also required for systemic infection with SBLV. We have recently found that the C-terminus proximal phenylalanine residue is important for virion formation in BMV [30]. This residue is also conserved in SBLV CP. Overall, CP sequences are similar among the four bromoviruses. However, we have not yet identified the amino-acid sequence differences in the CPs of SBLV and the other bromoviruses that confer unique properties on SBLV virions [45].

Apart from these four ORFs, there is no evidence that the other small ORFs that are similar to the 2b gene of the cucumoviruses [11] are expressed in bromoviruses. We identified other candidate ORFs, which are located in the central region of the SBLV 3a gene in a different frame, and on the (–) strand of RNA3 corresponding to the CP-

encoding region. The disruption of these ORFs did not affect the infectivity or symptoms of SBLV infection of *N. benthamiana*, *G. globosa*, *C. quinoa*, cowpea, or *A. thaliana* (data not shown), indicating that the products of these candidate ORFs are not essential for SBLV infection.

Phylogenetic analysis of the four bromoviruses was performed using the MEGA2 program [23], and phylogenetic trees were constructed with the neighbour-joining (NJ) method [40]. In phylogenetic analyses based on the amino acid sequences of the 1a, 2a, and 3a proteins, and CP, BBMV was the most distantly related of the four bromoviruses (data not shown). On the other hand, although BMV, CCMV, and SBLV are closely related, the phylogenetic relationships between the three bromoviruses were not consistent when different viral proteins were compared. This may reflect reassortment and recombination events among natural infections of bromoviruses, as have been observed for the cucumoviruses [47]. Then, we compared the characteristics of nucleotide sequences in the noncoding region among four bromoviruses (Fig. 3). In this comparison, the distant relationship of BBMV in four bromoviruses was confirmed, because BBMV has some unique characteristics (e.g., adenine at the 5' terminus, lack of a D-arm within the tRNA-like structure, and the longest poly(A) tracts of the four bromoviruses). Moreover, Fig. 3 shows that the characteristics of the noncoding sequences of BMV are most different from those of BBMV. SBLV and CCMV have intermediate characteristics between BMV and BBMV. In the relationship between BMV, CCMV, and SBLV, SBLV is likely to be more closely related to CCMV than to BMV, considering the average length of their poly(A) tracts and the host ranges described in Table 1. Furthermore, SBLV contains both of the unique sequences that occur in the noncoding regions of BMV and CCMV: the box B motif in the ICR of BMV RNA3, and the subgenomic promoter-like sequence in the 5' noncoding region of CCMV RNA3. Therefore, the genome organization of SBLV may reflect that of an ancestor common to both BMV and CCMV, or that of a virus intermediate between BMV and CCMV.

Acknowledgements

We thank Paul Ahlquist for the cDNA clones of BMV M1 and CCMV M1 strains, and Akira Kawabe, Motoyasu Yoshii and Masayuki Ishikawa for technical assistance. This work was supported in part by a Grant-in-Aid (12052201) for Scientific Research on Priority Area (A) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan and a Grant-in-Aid (JSPS-RFTF96L00603) for the "Research for the Future" program, a Grant-in-Aid (13660049) for Scientific Research (C), and a Grant-in-Aid (13306005) for Scientific Research (A) from the Japan Society for the Promotion of Science.

References

1. Ahlquist P, Dasgupta R, Kaesberg P (1981) Near identity of 3' RNA secondary structure in bromoviruses and cucumber mosaic virus. *Cell* 23: 183–189
2. Ahlquist P, Luckow V, Kaesberg P (1981) Complete nucleotide sequence of brome mosaic virus RNA3. *J Mol Biol* 153: 23–38
3. Ahlquist P, Dasgupta R, Kaesberg P (1984) Nucleotide sequence of the brome mosaic virus genome and its implications for viral replication. *J Mol Biol* 172: 369–383
4. Ahlquist P, French R, Janda M, Loesch-Fries LS (1984) Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7066–7070
5. Allison RF, Janda M, Ahlquist P (1988) Infectious in vitro transcripts from cowpea chlorotic mottle virus cDNA clones and exchange of individual RNA components with brome mosaic virus. *J Virol* 62: 3581–3588
6. Allison RF, Janda M, Ahlquist P (1989) Sequence of cowpea chlorotic mottle virus RNAs 2 and 3 and evidence of a recombination event during bromovirus evolution. *Virology* 172: 321–330
7. Damayanti TA, Nagano H, Mise K, Furusawa I, Okuno T (1999) Brome mosaic virus defective RNAs generated during infection of barley plants. *J Gen Virol* 80: 2511–2518
8. Dean C (2000) Big ideas from small plant. *Science* 290: 2071
9. Dennis C, Surridge C (2000) *A. thaliana* genome. *Nature* 408: 791–826
10. Diez J, Ishikawa M, Kaido M, Ahlquist P (2000) Identification and characterization of a host protein required for efficient template selection in viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3913–3918
11. Ding SW, Anderson BJ, Haase HR, Symons RH (1994) New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome. *Virology* 198: 593–601
12. Duggal R, Rao ALN, Hall TC (1992) Unique nucleotide differences in the conserved 3' termini of brome mosaic virus RNAs maintained through their optimization of genome replication. *Virology* 173: 456–464
13. Dzianott AM, Bujarski JJ (1991) The nucleotide sequence and genome organization of the RNA-1 segment in two bromoviruses: broad bean mottle virus and cowpea chlorotic mottle virus. *Virology* 185: 553–562
14. Eckardt NA (2001) *Arabidopsis* genome conference 2000: How a small weed changed the world. *Plant Cell* 13: 5–10
15. Eckardt NA, Araki T, Benning C, Cubas P, Goodrich J, Jacobsen SE, Masson P, Nambara E, Simon R, Somerville S, Wasteneys G (2001) *Arabidopsis* research

2001. *Plant Cell* 13: 1973–1982
16. Frohman MA (1990) RACE: Rapid amplification of cDNA ends. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols*. Academic Press, San Diego, pp 28–38
17. Fujiwara T, Hirai MY, Chino M, Komeda Y, Naito S (1992) Effects of sulfur nutrition on expression of the soybean seed storage protein genes in transgenic petunia. *Plant Physiol* 99: 263–268
18. Gubler U, Hoffman BJ (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25: 263–269
19. Janda M, French R, Ahlquist P (1987) High efficiency T7 polymerase synthesis of infectious RNA from cloned brome mosaic virus cDNA and effects of 5' extensions on transcript infectivity. *Virology* 158: 259–262
20. Kroner P, Richards D, Traynor P, Ahlquist P (1989) Defined mutations in a small region of the brome mosaic virus 2 gene cause diverse temperature-sensitive RNA replication phenotypes. *J Virol* 63: 5302–5309
21. Kroner PA, Young BM, Ahlquist P (1990) Analysis of the role of brome mosaic virus 1a protein domains in RNA replication, using linker insertion mutagenesis. *J Virol* 64: 6110–6120
22. Kroner P, Ahlquist P (1992) RNA-based viruses. In: Gurr SJ, McPherson MJ, Bowles DJ (eds) *Molecular Plant Pathology; A Practical Approach* vol.1. Oxford University Press, New York, pp 23–34
23. Kumer S, Tamura K, Jacobsen I, Nei M (2000) MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis, version 2.0. Pennsylvania and Arizona State Universities, University Park, Pennsylvania and Tempe, Arizona
24. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685
25. Lane LC (1981) Bromoviruses. In: Kurstak E (ed) *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, pp 333–376
26. Lee WM, Ishikawa M, Ahlquist P (2001) Mutation of host $\Delta 9$ fatty acid desaturase inhibits brome mosaic virus RNA replication between template recognition and RNA synthesis. *J Virol* 75: 2097–2106
27. Mise K, Allison RF, Janda M, Ahlquist P (1993) Bromovirus movement protein genes play a crucial role in host specificity. *J Virol* 67: 2815–2823
28. Mise K, Ahlquist P (1995) Host-specificity restriction by bromovirus cell-to-cell movement protein occurs after initial cell-to-cell spread of infection in nonhost plants. *Virology* 206: 276–286
29. Noueir AO, Chen J, Ahlquist P (2000) A mutant allele of essential, general

- translation initiation factor *DED1* selectively inhibits translation of a viral mRNA. Proc Natl Acad Sci USA 97: 12985–12990
30. Okinaka Y, Mise K, Suzuki E, Okuno T, Furusawa I (2001) The C terminus of brome mosaic virus coat protein controls viral cell-to-cell and long-distance movement. J Virol 75: 5385–5390
 31. Okuno T, Furusawa I (1978) Modes of infection of barley protoplasts with brome mosaic virus. J Gen Virol 38: 409–418
 32. Pacha RF, Ahlquist P (1992) Substantial portions of the 5' and intercistronic noncoding regions of cowpea chlorotic mottle virus RNA3 are dispensable for systemic infection but influence viral competitiveness and infection pathology. Virology 187: 298–307
 33. Pogany J, Hung Q, Romero J, Nagy PD, Bujarski JJ (1994) Infectious transcripts from PCR-amplified broad bean mottle bromovirus cDNA clones and variable nature of leader regions in RNA3 segment. J Gen Virol 75: 693–699
 34. Pogue GP, Marsh LE, Hall TC (1990) Point mutations in the ICR2 motif of brome mosaic virus RNAs debilitate in the (+)-strand replication. Virology 188: 742–753
 35. Pogue GP, Hall TC (1992) The requirement for a 5' stem-structure in brome mosaic virus replication supports a new model for viral positive-strand RNA initiation. J Virol 66: 674–684
 36. Quadt R, Kao CC, Browing KS, Hershberger RP, Ahlquist P (1993) Characterization of a host protein associated with brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 90: 1498–1502
 37. Romero J, Dzianott AM, Bujarski JJ (1992) The nucleotide sequence and genome organization of the RNA2 and RNA3 segments in broad bean mottle virus. Virology 187: 671–681
 38. Roossinck MJ, Bujarski J, Ding SW, Hajimorad R, Hanada K, Scott S, Tousignant M (2000) Family *Bromoviridae*. In: van Regemortel MHV et al. (eds) Virus Taxonomy. Academic Press, San Diego, pp 923–935
 39. Sacher R, Ahlquist P (1989) Effects of deletions in the N-terminal basic arm of brome mosaic virus coat protein on RNA packaging and systemic infection. J Virol 63: 4545–4552
 40. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406–425
 41. Sasaki N, Fujita Y, Mise K, Furusawa I (2001) Site-specific single amino acid changes to Lys or Arg in the central region of the movement protein of a hybrid bromovirus are required for adaptation to a nonhost. Virology 279: 47–57
 42. Schmitz I, Rao ALN (1996) Molecular study on bromovirus capsid protein; I. Characterization of cell-to-cell movement-defective RNA3 variants of brome

mosaic virus. *Virology* 226: 281–293

43. Sullivan ML, Ahlquist P (1999) A bromovirus intergenic RNA3 replication signal functions with viral replication protein 1a to dramatically stabilize RNA in vivo. *J Virol* 73: 2622–2632
44. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680
45. Valverde RA (1985) Spring beauty latent bromovirus: A new member of the bromovirus group. *Phytopathology* 75: 395–398
46. Valverde RA, Glascock CB (1991) Further examination of the RNA and coat protein of spring beauty latent virus. *Phytopathology* 81: 401–404
47. White PS, Morales F, Roossinck MJ (1995) Interspecific reassortment of genomic segments in the evolution of cucumoviruses. *Virology* 207: 334–337
48. Yoshii M, Yoshioka N, Ishikawa M, Naito S (1998) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* mutant in which accumulation of cucumber mosaic virus coat protein is delayed. *Plant J* 13: 211–219

Table 1. Infectivity of bromovirus virion RNAs and *in vitro* transcripts of SBLV

Plant	BMV		CCMV		SBLV		SBLV	
	virion RNA		virion RNA		virion RNA		transcripts	
	I	U	I	U	I	U	I	U
<i>A. thaliana</i> (Col-0)	—	—	+	+ ^a	+	+	+	+
<i>N. benthamiana</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>G. globosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. quinoa</i>	+	+	+	—	+	—	+	—
Pea	—	—	+	+	+	+	+	+
Cowpea	—	—	+	+	—	—	—	—
Barley	+	+	—	—	—	—	—	—

I, inoculated leaves; U, uninoculated upper leaves; +, CP detected; —, CP not detected. Western blot analysis using anti-BMV antiserum was performed at 14 days post-inoculation of inoculated rosette leaves and uninoculated cauline leaves of plants inoculated with virion RNAs (0.1 µg/µl) or *in vitro* transcripts (0.3 µg/µl), as described previously [4].

^a CCMV CP showed low-level accumulation. Refer to the text for details.

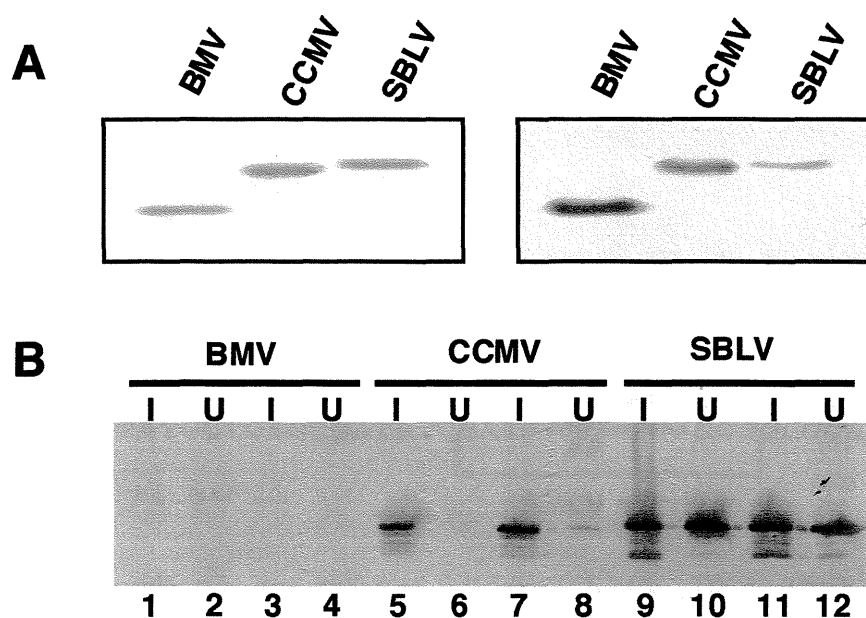


Fig. 1. (A) Cross-reaction of anti-BMV antiserum. BMV, CCMV, and SBLV CPs were separated by electrophoresis on a 12.5% polyacrylamide gel containing SDS [24], and stained with Coomassie brilliant blue R-250 (left), or detected immunologically with anti-BMV antiserum (right). Tenfold less of each bromovirus CP was loaded in the right panel than in the left panel. (B) Infectivity of BMV (lanes 1–4), CCMV (lanes 5–8), and SBLV (lanes 9–12) in *A. thaliana* Col-0. Virion RNAs of the three bromoviruses were used as inocula. Inoculated (I) rosette leaves and uninoculated (U) upper cauline leaves were harvested at 14 dpi. Western blotting analysis with anti-BMV antiserum was used to detect viral CP accumulation. CP accumulation in two independent plants is represented for each bromovirus infection. Total proteins from Col-0 leaves (1.25 mg fresh tissue) were loaded in each lane.

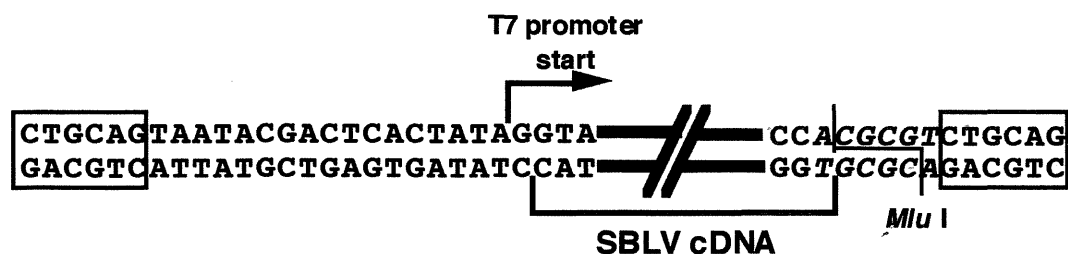


Fig. 2. Partial nucleotide sequences of full-length SBLV cDNA clones. The *Pst*I site used to clone SBLV cDNAs and the *Mlu*I site for the linearization of cloned plasmids are represented by boxed and italicized bases, respectively. A bent arrow indicates the T7 promoter start site. The transcripts are predicted to have one additional G residue at the 5' terminus, and possibly four extra non-viral residues (CGCG) at the 3' terminus of the viral genomic segments generated from the *Mlu*I recognition sequence.

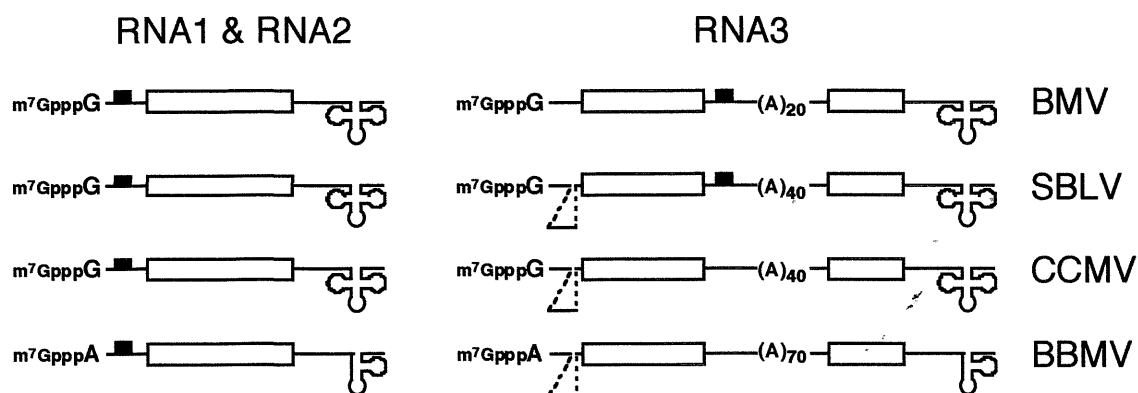


Fig. 3. Schematic sequence alignment of genomic RNAs of BMV, SBLV, CCMV, and BBMV. All coding and much of the noncoding sequences of each genome show extensive similarity among these four viruses. Similar sequences are aligned on horizontal axes that pass through the centre of the boxed genes. Because the overall noncoding sequences of RNA1 and RNA2 are common in each virus species, both RNAs are aligned together. The 5' cap (m⁷G) and the first nucleotide of each RNA are shown. The cloverleaf structures represent the tRNA-like domains at the 3' termini of RNAs; the D-arm is absent only from BBMV RNAs. Insertions in RNA segment(s) relative to the other(s) are removed below the appropriate horizontal axis with dashed lines. The box B motif is shown as a small closed box. The lengths of the oligo(A) tracts in the intergenic region of each RNA3 are also given.

第2部

シロイヌナズナを用いた新規ブロモウイルスの 感染に関与する宿主植物因子の探索

序 論

植物の病気は、ウイロイド、ウイルス、細菌、糸状菌、線虫などの様々な病原体によって引き起こされる。その中でウイルスはゲノムの核酸とそれを保護するタンパク質から構成される最小の病原体の一つである。ウイルスに感染した植物の多くは、モザイク、黄化、萎縮、え死などの様々な病徴を発現し、さらに植物体の各器官に対して激しい生育障害を起こす。植物ウイルスは農作物に感染すると多大な被害を与えるため、その防除は非常に重要である。植物ウイルス病の防除においては、我々が肉眼的に見分けることのできる生理的、あるいは形態的な異常を抑えること、そして植物ウイルスが全身に拡がるのを抑制し、植物体全体での増殖を回避することが重要である。このためには、植物ウイルスが宿主植物で増殖し、病徴を引き起こすメカニズムを解明することが必要である。

植物ウイルスは宿主植物に傷などから侵入すると、まず初期感染細胞でウイルスゲノムの複製を行い、次いで原形質連絡 (Plasmodesmata) を介して隣接細胞へと移行する (細胞間移行)。その後、植物の維管束系を通して上位の葉へと移行 (長距離移行) することにより全身感染を成立させる。これらの各感染過程の成立および病徴発現には、ウイルス側の因子と共に植物側の因子も重要な役割を果たしていると考えられている (Carrington *et al.*, 1996; Séron and Haenni, 1996)。近年、ウイルス側の因子に関する研究が進んできている一方で、宿主因子に関しては、植物の生物としての複雑さゆえにほとんど知見が得られてきていないのが現状である。植物ウイルスの感染メカニズムを解明するためには、宿主因子の同定や、その機能解析を行っていくことが必要である。

植物ウイルスの感染に関与する宿主因子を単離・同定するための手法の一つとして、Two-hybrid 法や Far-western 法といった、物理的相互作用に基づいたものがある。この手法は、プローブとして用いるウイルスのタンパク質と直接相互作用する宿主因子候補タンパク質をコードする遺伝子を単離するものである。これまでに、Two-hybrid 法を用いて報告された宿主因子として、*Wheat dwarf virus* の複製タンパク質 RepA と相互作用する GRAB1 および GRAB2 (Xie *et al.*, 1999)、

Turnip crinkle virus (TCV) の移行タンパク質 p8 と相互作用する Atp8 (Lin and Heaton, 2001)、*Cowpea mosaic virus* の 60K タンパク質と相互作用する VAP27-1 および VAP27-2 (Carette *et al.*, 2002) 等が知られ、また、Far-western 法を用いて単離された宿主因子として、*Tomato mosaic virus* (ToMV) の移行タンパク質と相互作用する NtMBF1a (Matsushita *et al.*, 2002) 等が報告されてきている。これらの手法は、宿主因子が宿主の生存に必須であったり、複数の遺伝子によってコードされていたりする場合でも単離が可能であるといった長所がある反面、選抜された候補宿主因子が、生体内におけるウイルス増殖に実際に関与しているかどうかは明確でないといった短所もある。

一方、宿主因子を単離・同定する別の手法として、モデル植物 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (シロイヌナズナ) を用いた遺伝学的手法が挙げられる。シロイヌナズナは、小型で世代時間が短いため実験室内で容易に栽培でき、自家受精して多数の種子をつけるが、人工交配や形質転換も可能である。また、 $n=5$ の 2 倍体で、ゲノムサイズは約 125 Mbp と既知の高等植物の中で最小である。このような特徴から、シロイヌナズナは分子遺伝学的解析を行う上で優れた研究材料として評価されている。2000 年には国際的協力のもとでゲノムの全塩基配列が決定され、分子遺伝学的解析のための環境整備も進んでいる。ウイルス感染に必要な宿主因子の単離を目的として、これまでに植物ウイルスの増殖を阻害するシロイヌナズナの変異体はいくつか単離されてきている。*Tobacco mosaic virus* のアブラナ科系統 (TMV-Cg) の複製に影響する *tom1*、*tom2* および *tom3* 変異体 (Ishikawa *et al.*, 1991; Ohshima *et al.*, 1998; Yamanaka *et al.*, 2002)、*Cucumber mosaic virus* 黄化系統 (CMV-Y) の細胞間移行に影響する *cum1* および *cum2* 変異体 (Yoshii *et al.*, 1998a; b)、また、*Turnip vein clearing virus* の長距離移行に影響する *vsm1* 変異体 (Lartey *et al.*, 1998) などが知られている。現在までにそれらのいくつかについては原因遺伝子が既に単離・同定されている (Yamanaka *et al.*, 2000; 2002; Tsujimoto *et al.*, 2003)。また、シロイヌナズナのアクセション間におけるウイルス感染性の違いを利用した研究からは、TCV に対する過敏感反応 (HR) に関与する *HRT* (Dempsey *et al.*, 1993; 1997; Cooley *et al.*, 2000)、CMV-Y に対する HR に関与する *RCY1* (Takahashi *et al.*, 1994; 2002)、また、*Tobacco etch virus* (TEV) の長距離移行を阻害する *RTM1* および *RTM2* (Mahajan *et al.*, 1998; Chisholm *et al.*, 2000; Whitham *et al.*, 1999; 2000) など、主として抵抗性に関与する宿主因子が報告されている。遺伝学的手法で同定された宿主因子は生体内でウイルス増殖に関与していることが確実であり、シロイヌナズナを用いる手法は非常に有効であると言える。

ブロモウイルスは 3 分節の (+) センス一本鎖 RNA をゲノムとして持つ球状ウイルスである。これまでブロモウイルスに関する研究は、主として *Brome mosaic virus* (BMV) と *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) を用いて行われ、感染に関わる様々なウイルス側の因子について詳細な解析が進められてきた。一方、宿主

植物因子に関しては、BMV 感染オオムギから BMV の RNA 依存 RNA 合成酵素画分を抽出することにより、試験管内において BMV のマイナス鎖 RNA 合成を促進する宿主植物因子として、翻訳開始因子 eIF3 が同定されている (Quadt *et al.*, 1993)。また最近 Two-hybrid 法により、BMV の外被タンパク質と相互作用し、ウイルス感染に関与するオオムギ因子として HCP1 タンパク質が同定された (Okinaka *et al.*, 2003)。現在までにプロモウイルスの感染に関わる宿主植物因子として報告されているものはこれらのみである。Ahlquist らのグループによって、酵母を用いた系を利用し、BMV の複製に関与する宿主因子の同定が精力的になされてはいるものの (Diez *et al.*, 2000; Noueiry *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001)、植物においてしか見られないウイルスの移行に関わる宿主因子に関する知見は得られて来ていない。この原因の一つとして、BMV や CCMV がモデル植物のシロイヌナズナに低い感染性しか示さないことが考えられる。しかし近年、*Bromovirus* 属に分類される *Spring beauty latent virus* (SBLV) がシロイヌナズナに無病徴であるが効率よく全身感染することが明らかになり (Fujisaki *et al.*, 2003a)、SBLV とシロイヌナズナを用いて、プロモウイルスの感染に関わる宿主植物因子を遺伝学的手法により単離することが可能となった。

そこで本研究では、SBLV の増殖に関与する宿主側の遺伝子の単離・同定を目的として、第 1 章では SBLV 感染に影響を与えるシロイヌナズナ変異体の選抜、第 2 章では SBLV の細胞間移行が遅延するシロイヌナズナのアクセション Pla-0 の同定を行った。また、第 3 章では SBLV の病徴発現に関与するシロイヌナズナの遺伝子座 *SSB1* を同定した。

宿主因子の同定も可能であるというメリットがある。プロモウイルスでは、出芽酵母を宿主として用いた研究があり、実際に BMV の複製に関与する酵母の宿主因子 *LSM1*、*DED1* および *OLE1* が単離された (Diez *et al.*, 2000; Noueiry *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001)。高等植物を使って変異体の単離を行うのは難しいが、近年、モデル植物のシロイヌナズナを宿主として用いることで、植物ウイルスの増殖に必要な宿主因子を同定した例がいくつか報告されている。TMV-C_g のゲノム複製に関与する宿主因子遺伝子として、*TOV1* 遺伝子および *TOV2* 遺伝子が報告されている (Ishikawa *et al.*, 1991, 1993; Ohashima *et al.*, 1998)。*TOV1* 遺伝子は既に同定され、7 回複製酵素タンパク質をコードすることや、TMV-C_g の複製酵素タンパク質のペリカーゼ領域と結合する性質を持つことが示されており、ウイルス複製時にウイルスの複製複合体を複製場所である小胞体膜上につなぎとめる役割を果たしていると考えられている (Yamanaka *et al.*, 2000)。さらに、*tom1* 変異体では TMV-C_g の蓄積量が減少するものの、その蓄積が相変わらず認められることから、*tom1* 変異体を再度突然変異誘起処理して TMV 蓄積が認められなくなる二重変異体の選抜が行われた。この結果、*TOV1* 遺伝子のホモログである *TOV2* 遺伝子が単離・同定されている (Yamanaka *et al.*, 2002)。*TOV2* 遺伝子に関する研究も進んでおり、*tom2* 変異体では *TOV2a* と *TOV2b* という二種類の遺伝子が発現され

第1章

Spring beauty latent virus の感染に影響を与える

シロイヌナズナ変異体の選抜

II-1. 緒言

植物ウイルスが植物に全身感染する過程は、初期感染細胞におけるウイルスゲノムの複製、隣接する細胞への細胞間移行、そして植物の維管束系を通して上位の葉へと移動する長距離移行の3つに分けられる。植物ウイルスがある植物において全身感染する場合、その植物は、ウイルスが3つの感染過程を成立させるために必要な宿主因子を、完全なセットとして持っていると考えられる。

宿主因子を同定する方法の一つとして、ウイルスの感染を許容する宿主に突然変異誘起処理を施して、ウイルス増殖に影響の出た変異体を選抜し、その原因遺伝子を同定するといった遺伝学的手法がある。この方法では、宿主の生存に必須である遺伝子や、機能的に相同な複数の遺伝子が存在する遺伝子を単離することが難しいと考えられる。しかし、この方法で同定された宿主因子は生体内においてウイルス増殖に関与していることが確実であり、ウイルス側の因子と間接的な相互作用しか持たないような宿主因子の同定も可能であるというメリットがある。プロモウイルスでは、出芽酵母を宿主として用いた研究があり、実際に BMV の複製に関与する酵母の宿主因子 *LSM1*、*DED1* および *OLE1* が単離された (Diez *et al.*, 2000; Noueir *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001)。高等植物を使って変異体の単離を行うのは難しいが、近年、モデル植物のシロイヌナズナを宿主として用いることで、植物ウイルスの増殖に必要な宿主因子を同定した例がいくつか報告されている。TMV-Cg のゲノム複製に関与する宿主因子遺伝子として、*TOM1* 遺伝子および *TOM2* 遺伝子が報告されている (Ishikawa *et al.*, 1991; 1993; Ohshima *et al.*, 1998)。*TOM1* 遺伝子は既に同定され、7 回膜貫通型タンパク質をコードすることや、TMV-Cg の複製酵素タンパク質のヘリカーゼ領域と結合する性質を持つことが示されており、ウイルス複製時にウイルスの複製複合体を複製場所である小胞体膜上につなぎとめる役割を果たしていると推測されている (Yamanaka *et al.*, 2000)。さらに、*tom1* 変異体では TMV-Cg の蓄積量が減少するものの、その蓄積が相変わらず認められることから、*tom1* 変異体を再度突然変異誘起処理して TMV 蓄積が認められなくなる二重変異体の選抜が行われた。この結果、*TOM1* 遺伝子のホモログである *TOM3* 遺伝子が単離・同定されている (Yamanaka *et al.*, 2002)。*TOM2* 遺伝子に関する研究も進んでおり、*tom2* 変異体では *TOM2A* と *TOM2B* という二種類の遺伝子が破壊され

ていたこと、TOM2A タンパク質は 4 回膜貫通型タンパク質であり、TOM1 タンパク質と相互作用することが報告されている (Tsujiimoto *et al.*, 2003)。また、CMV-Y の細胞間移行に影響する *cum1* (Yoshii *et al.*, 1998a) および *cum2* 変異体 (Yoshii *et al.*, 1998b) を用いた研究から、*CUM1*、*CUM2* 遺伝子はそれぞれ翻訳開始因子 eIF4E と eIF4G をコードしていることが分かっている (吉井・石川、私信)。さらに *Turnip mosaic virus* の感染が阻害される変異体から、その原因遺伝子として *eIF (iso) 4E* が同定されている (Lellis *et al.*, 2002; Duprat *et al.*, 2002)。

SBLV は、シロイヌナズナのアクセッション Columbia-0 (Col-0) に効率良く全身感染するプロモウイルスであり (Fujisaki *et al.*, 2003a)、SBLV を用いることによって、プロモウイルスの感染に関与する宿主因子を、シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的手法により単離することが可能となった。ウイルスと宿主因子との相互作用には特異性があると考えられており、SBLV 感染は *TOM1* や *TOM2* などの既知の宿主因子における変異の影響を受けないことが示されている (藤崎、私信) ことから、SBLV は未知の宿主因子を利用して増殖していると考えられる。そこで本研究では SBLV の感染に関与する宿主因子を、Col-0 変異体を用いた遺伝学的手法により単離することを試みた。エチルメタンスルホン酸 (EMS) により突然変異誘起処理した Col-0 の種子由来の植物を自殖させて得た M2 植物のうち、SBLV の増殖が阻害された個体を選抜し、原因遺伝子を探索することによって、SBLV の増殖に必要な宿主因子の単離・同定を目指した。2,231 個体の M2 植物について SBLV 感染性を調査し、SBLV 増殖が遅延する変異体を 1 ライン (2433B) 選抜した。遺伝学的解析から 2433B における SBLV 増殖の遅延は劣性の形質によって支配されていることを示し、さらに 2433B は細胞間移行の段階で影響を受けていることを明らかにした。

1-2. 材料と方法

植物体の育成

シロイヌナズナのアクセッション Col-0 の種子は、オハイオ州立大学 Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) の Randall Scholl 博士より提供されたものを使用した。また、Col-0 をバックグラウンドにした EMS 処理 M2 種子は Lehle Seeds 社 (テキサス州、<http://www.arabidopsis.com/>) より購入した。

シロイヌナズナ を育成する土壌にはロックウール (日東紡マテリアル社) を使用し、水を張ったトレイに置いて十分に水を含ませた後、Arasystem (ベーターテック社) の Araflat につめて用いた。播種には竹串を使用し、水で濡らした先端で種子に触れ、付着した種子を 1 ポット当たり 4 粒播いた。4℃暗黒条件下で 2 日間低温処理した後、25℃、一日あたり 16 時間の日長条件下で育成した。肥料は 1×Hoagland 培地溶液 (Dhingra and Sinclair, 1985) を使用し、発

芽後、土壌が乾かない程度に適宜与えた。採種に際しては、採種個体をロックウールごと取り出し、Jiffy pot (Jiffy A/S 社) に移植した。培養土にはバーミキュライトを使用し、OHP フィルム (十千万 (株)) を筒状にしたものを立てて植物体を囲った。鞘や茎が薄茶色になり、鞘が縦裂し始めたら、鞘を茎ごと封筒に入れて1週間以上自然乾燥させた後、エッペンチューブに集めた。

SBLV を調製するための propagation host としては、センニチコウ (*Gomphrena globosa*) を用いた。*G. globosa* は当研究室の育成室において、25℃、一日あたり16時間の日長条件下で Jiffy pot を用いて育成した。培養土にはバーミキュライトを使用し、1×Hoagland 培地溶液によって育成した。

ウイルスの精製

SBLV は Valverde ら (1985) の方法に従い精製した。SBLV に感染した *G. globosa* の葉 1.0 g 当たり、1.0 ml の 0.02 M リン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) と 500 μ l のクロロホルム/n-ブタノール (1:1) 混液を加え、乳鉢で磨砕した。磨砕液を4重のガーゼで濾過し、4℃で一晩静置した。その後遠心分離 (2,500 \times g, 10分, 4℃) し、上清を更に遠心分離 (80,000 \times g, 90分, 4℃) した。沈殿に 500 μ l の 0.01 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) を加え、4℃で一晩静置して懸濁した。この懸濁液を遠心分離 (2,500 \times g, 5分, 4℃) し、その上清を 0.2-2.0 M ショ糖密度勾配 (0.01 M リン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) で調製) に重層し、遠心分離 (70,000 \times g, 150分, 25℃) した。その後、注射器でウイルスのバンドを吸い取り、0.01 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) で10倍に希釈した後、遠心分離 (80,000 \times g, 90分, 4℃) した。沈殿に 500 μ l の 0.01 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) を加え、4℃で一晩静置して懸濁した。この懸濁液に 50 μ l のエチレングリコールを加え、-80℃で保存した。また、ToMV は Takeuchi ら (1999) の方法に従い精製し、-80℃で保存した。

in vitro 転写反応

SBLV RNA1、RNA2 および RNA3 の cDNA クローン (pSB1TP6、pSB2TP7 および pSB3TP9 [Fujisaki *et al.*, 2003b]) は *Mlu*I で切断し、BMV RNA1、RNA2 および RNA3 の cDNA クローン (pB1TP3、pB2TP5 および pB3TP8 [Janda *et al.*, 1987]) は *Eco*RI で切断し、CCMV RNA1、RNA2 および RNA3 の cDNA クローン (pCC1TP1、pCC2TP2 および pCC3TP4 [Allison *et al.*, 1988]) は *Xba*I で切断し、これを鋳型として T7 RNA ポリメラーゼによりキャップ存在下で転写反応を行った (Kroner and Ahlquist; 1992)。

ウイルス粒子および転写物の植物体への接種

G. globosa への SBLV 粒子の接種は、播種5週間後の個体の、できるだけ上

位の大きめの葉に行った。接種濃度は 500 $\mu\text{g/ml}$ とし、カーボランダムをふりかけた葉に接種した。

シロイヌナズナへのウイルス粒子の接種は、播種約 4 週間後の、ロゼッタ葉が完全に展開し、花茎の芽が認められた個体に行った。接種葉には大きく展開した 2 枚のロゼッタ葉を選び、カーボランダムをふりかけた後、ガスバーナーで先端を曲げたパスツールピペットを用いて接種した。接種濃度は、SBLV 粒子は 500 $\mu\text{g/ml}$ 、ToMV 粒子は 10 $\mu\text{g/ml}$ とした。BMV、CCMV および SBLV の転写物は、RNA1、2、3 の濃度をそれぞれ 200 $\mu\text{g/ml}$ とした混合液を調製し、接種時に 1/10 量の 5% ベントナイトを加え、粒子と同様に接種した。

プロトプラストの調製とウイルス接種

シロイヌナズナのプロトプラストの調製は次の通り行った。播種 4~5 週間後の植物体のロゼッタ葉約 5 g を剃刀で細く刻み、それをポリプロピレン製遠心管に入れた 20 ml の酵素液 (1% セルラーゼ、0.05% マセロザイム、0.6 M マンニトール、pH 6.0) に浸して、軽く振盪しながら 25°C で 3.5 時間培養した。その液を 4 層のガーゼで濾過し、濾液を遠心分離 (40 \times g、3 分、室温) した。その沈澱を洗浄液 (0.6 M マンニトール、10 mM CaCl_2 、pH 6.5) で 2 回洗浄した後、沈澱を洗浄液に再懸濁し、1 接種区あたり $1.0\sim 5.0\times 10^5$ 個のプロトプラストとなるように分注した。接種源として SBLV 転写物 (RNA1、2、3 全体で 6.0 μg) を接種した。プロトプラストへのウイルス接種は Kroner and Ahlquist (1992) の方法に従った。

ノーザンブロッティング法

プロトプラストからの total RNA の抽出は以下のようにして行った。500 μl の静置培養したプロトプラスト培養液に 200 μl の RNA 抽出バッファー (1 M グリシン/1 M NaCl/10 mM Na_2EDTA 溶液、10% SDS 溶液、5% ベントナイト溶液、および DW を 2:2:1:1 の比で混合したもの) を加え vortex した。その後、500 μl のフェノール/クロロホルム処理を 2 回行い、650 μl のイソプロパノール、65 μl の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と混合し、遠心分離で沈澱させ、70% エタノール洗浄の後、減圧乾燥した。これに 8 μl の DDW と 32 μl の RNA 試料バッファー [1.6 ml のホルムアルデヒド、5.0 ml のホルムアミド、0.5 ml の 20 \times MOPS (0.4 M MOPS、0.1 M 酢酸ナトリウム、0.02 M Na_2EDTA)、1.6 ml のグリセリン、0.8 mg のブROMフェノールブルーおよび 0.16 mg のキシレンシアノールを混合したもの] を加えて懸濁し、1.5% アガロースゲル電気泳動した。泳動後、ゲル中の RNA をハイブリダイゼーション用ナイロンメンブレン (Hybond N; Amersham) にブロッティングした。

SBLV RNA の検出には DIG-UTP (Roche Diagnostics K.K.) でラベルしたリボプローブを用いた。プローブ調製用の鋳型としては、SBLV RNA1、2 では *Clal*

切断した pSB1MC101、pSB2MC102 を、SBLV RNA3 では *Sa*II 切断した pSB3MC103 を用いた (Fujisaki *et al.*, 2003b)。

Coomassie brilliant blue (CBB) 染色

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) によってタンパク質を分離し、CBB 染色を行った。ゲルを CBB 染色液 [0.25% (w/v) CBB-R250、50% (v/v) メタノール、5% (v/v) 酢酸] で 1 時間染色した後、脱色液 [25% (v/v) メタノール、7.5% (v/v) 酢酸] でバックグラウンドが消えるまで振盪した。

ウエスタンブロッティング法

SDS-PAGE によって分離したタンパク質をナイロンメンブレン (Immobilon-PTTM, Millipore) に転写し、3% (w/v) スkimミルクを含む TTBS [20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, pH7.5] でブロッキングした。BMV、CCMV および SBLV CP 検出用の 1 次抗体液にはウサギ由来の抗 BMV 抗血清 (PVAS-178, American Type Culture Collection) を TTBS で 50,000 倍希釈したものを用いた。ToMV CP 検出用の 1 次抗体にはウサギ由来の抗 ToMV 抗血清を用いた。2 次抗体液にはアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (BioRad) を TTBS で 3,000 倍希釈したものを用いた。発色には、175 μ g/ml の 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸と 337.5 μ g/ml のニトロブルーテトラゾリウムの溶解した AP バッファー (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 20 mM MgCl₂·6H₂O, pH9.5) を用いた。

SBLV CP の蓄積量の定量は以下のように行った。SBLV を接種したシロイヌナズナは接種葉、非接種上位ロゼッタ葉および花茎葉の 3 つに分けて、接種 3、4、5、6 日後にサンプリングし、それぞれ 2 個体由来の植物組織を 1 つのエッペンチューブに集めた。植物組織 1 mg あたり 2 μ l の 4×クラッキングバッファーと 5 μ l の DW を加え、ホモジナイズした。調製した植物磨砕液 1.5 μ l 中の SBLV CP をウエスタンブロッティング法により検出し、バンドの濃度から蓄積量を NIH image プログラム (National Institutes of Health) により数値化した。

ハンマーブロッティング法

ハンマーブロッティング法は Takahashi *et al.* (2001) の方法を参考にして以下のように行った。植物体をろ紙 (Whatman 3MM Chr) 上下一枚ずつではさみ、内部の植物体が動かないよう手で押さえながら金槌でろ紙を上からたたいてブロッティングした。たたき終えた後、プロットされた植物体をピンセットで取り除き、ろ紙を 1 時間以上風乾させた。

2 枚のろ紙のうち 1 枚を 2% (v/v) Triton X-100 で色素が消えるまで、室温で 60-90 分間振盪した。次いで 3% スkimミルクを含む TTBS (TTBS-スkimミ

ルク) で1時間ブロッキングした。SBLV CP 検出用の1次抗体液と2次抗体液には上記のものを TTBS-スキムミルクで同様に希釈して用いた。1次抗体液で1時間反応後、TTBS-スキムミルクで洗浄し(10分×2回)、2次抗体液で1時間反応させた。TTBS で洗浄(20分×2回)後、ウエスタンブロッティング法と同様に、発色による検出を行った。

人工交配

雌親には、花卉の先がまだ閉じているが、もう少しで開く状態の蕾を用いた。同じ花房内にある花や、交配に用いない蕾は取り除いた。実体顕微鏡下でピンセットを用いて4枚のがく片、4枚の花弁、6本の雄ずいを順に取り除いた。雄親には、花卉が全開している花を選んで根元から取り、ピンセットで花卉を除いた後、花たくをピンセットで挟んで雄ずいを露出させ、用意した雌ずいの柱頭に葯の開裂面を軽く叩いて受粉させた。交配に用いたピンセットは、70%エタノールでこまめに洗浄した。2、3日後に鞘が伸び始めることで受粉が成功したことを確認し、その後鞘が薄茶色になって開裂し始めた頃に採種した。

I-3. 結果

SBLV の増殖を阻害する Col-0 変異株の選抜

SBLV の増殖に必要な宿主因子を単離・同定することを目的として、SBLV の増殖を阻害するようなシロイヌナズナの変異体の選抜を試みた。Col-0 変異体に SBLV 粒子を接種し、接種6日後に花茎組織を切断して、ハンマーブロッティング法によりその感染性を調査した。

2,231 個体の、EMS 処理した Col-0 変異体 M2 植物について SBLV 感染性を調査したところ、SBLV 増殖が野生型 Col-0 と異なる表現型を示す変異体が 164 個体選抜された。これらの変異体の表現型としては、CP シグナルが野生型 Col-0 より薄いものや全く検出されないもの、シグナルの分布に組織特異的な偏りがあるものなどがあった。しかし、これらの変異体で SBLV 増殖が抑制された原因としては、接種の誤りや生理病などの SBLV 感染への影響や、検出時の失敗などによりシグナルが正常に検出されなかった可能性が考えられた。そこで1次選抜を通過した個体(ライン)については、残った植物体を育成して、その自殖により得た M3 種子を採種し、2次、3次選抜を行って表現型の再現性を調査した。2次選抜では1ラインあたり5~10個体の M3 植物の感染性を1次選抜と同様に調査し、さらに2次選抜を通過したラインについては、3次選抜として接種6日後の植物体全体における CP の分布をハンマーブロッティング法により調査し、ラインの絞り込みを行った。

これらの選抜により、1ライン(2433B)が SBLV の増殖を阻害するラインと

して選抜された。3 次選抜では、2433B は接種 6 日後において全身感染するものの、CP シグナルの拡がり植物体の一部に限られており、シグナルも野生型に比べて弱い様子が観察された (Fig. I-1)。また、2433B M3 植物の自殖により得た M4 植物に SBLV 粒子を接種し、接種 3 日後の接種葉における SBLV CP の蓄積量をウエスタンブロッティング法により調査した。その結果、M3 植物と同様に、供試した M4 植物 6 個体全てにおいて、野生型 Col-0 に比べて SBLV CP の蓄積量が抑えられており、選抜された 2433B 変異体は、変異をホモに持つことが明らかとなった (Fig. I-2)。2433B の植物体の形態は野生型の Col-0 と同様であったが、花茎の伸長する時期が野生型 Col-0 よりも 4~6 日程度早い様子が観察された。また、2433B では、野生型 Col-0 と同様に SBLV 感染に対して局部壊病斑などの病徴は観察されなかった (data not shown)。

遺伝学的解析

2433B において SBLV の感染性が低下する形質の遺伝学的性質を調査するために、2433B の M3 植物と野生型 Col-0 を人工交配して F_1 植物を作製し、これに SBLV 粒子を接種して、接種 3 日後の接種葉における CP 蓄積量をウエスタンブロッティング法により調査した。その結果、 F_1 植物 ($\text{♀Col-0} \times \text{♂2433B}$ および $\text{♀2433B} \times \text{♂Col-0}$) は、いずれを花粉親とした場合も野生型 Col-0 と同程度の CP 蓄積量を示した (Fig. I-2)。このことから、2433B において SBLV 感染を阻害している形質は核支配の劣性であることが明らかとなった。

2433B における SBLV の感染性

2433B における SBLV の感染性を詳細に調べるために、SBLV 感染性を経時的に調査した。ハンマーブロッティング法では野生型 Col-0 と 2433B との差が観察しにくかったため (data not shown)、接種葉、非接種上位ロゼッタ葉および花茎葉における SBLV CP 蓄積量を、CBB 染色およびウエスタンブロッティング法により経時的に調査した (Fig. I-3)。CBB 染色の結果、野生型 Col-0 では接種葉では接種 3 日後において、非接種上位ロゼッタ葉および花茎葉では接種 4 日後において既に SBLV CP と同じ泳動度のバンドがはっきりと観察された。一方 2433B では、接種葉と花茎葉では野生型 Col-0 より遅れて接種 5 日後から 6 日後に薄いバンドが検出され、非接種上位ロゼッタ葉ではバンドがほとんど検出されなかった。また、ウエスタンブロッティング法による、より高感度の検出においても、2433B では全ての部位において野生型 Col-0 より CP 蓄積が遅延される様子が観察され、さらに抗体の特異性から、CBB 染色で観察されたバンドが SBLV CP に由来することも確認された。

次に、野生型 Col-0 と 2433B における SBLV CP 蓄積量の違いを明らかにするために、経時的な CP 蓄積量の変化の定量解析を行った。接種 3 日後の野生型 Col-0 接種葉における CP 蓄積量を 100 として、接種 3、4、5、6 日後のそれぞ

れのサンプルにおける CP 蓄積量を相対値で示したものが Fig. 1-4A~C である。この結果、2433B では野生型 Col-0 に比べて、3 つの部位全てにおいて CP の蓄積量が低下あるいは遅延していることが明らかになった。特に蓄積量の差が顕著であったのは、接種 4 日後の花茎葉であり、2433B の CP 蓄積量は野生型 Col-0 の約 1/5 であった。しかし、接種後の日数が経過するに従って、野生型 Col-0 と 2433B の CP 蓄積量の差は小さくなってゆき、接種 6 日後の接種葉や花茎葉においては両者にほとんど差が見られなくなることが分かった。以上のことから、2433B では接種葉の段階から SBLV 感染に対して遅延が見られることが示された。

2433B プロトプラストにおける SBLV 増殖能

2433B では、1 細胞レベルにおける SBLV 増殖に影響が見られるかどうかを明らかにするために、プロトプラストにおける SBLV 増殖能を調査した。野生型 Col-0 と 2433B のプロトプラストに SBLV 転写物を接種し、接種 3、12、24 時間後の total RNA および total タンパク質を抽出した。SBLV RNA と CP の蓄積量はそれぞれノーザンブロットング法およびウエスタンブロットング法により調査した (Fig. I-5)。この結果、野生型 Col-0 と 2433B では、1 細胞レベルにおける SBLV RNA や CP の蓄積量に顕著な差は見られなかった。Fig. I-4D は実験を繰り返し、1 細胞レベルにおける SBLV CP の蓄積を定量化したものである。この結果からも、野生型 Col-0 と 2433B において、プロトプラストにおける SBLV CP の蓄積は同程度であることが示された。以上の結果から、2433B における SBLV 感染は、1 細胞レベルにおけるウイルス増殖の段階というよりは、細胞間移行の段階で影響を受けていることが示唆された。

2433B に見られるウイルス CP 蓄積量低下のウイルス特異性

2433B に SBLV とは異なるウイルスを接種し、その感染性に影響が見られるかどうかを調査した。SBLV と同じプロモウイルスに属する BMV および CCMV の転写物、そしてシロイヌナズナに全身感染することが知られているトバモウイルス属の ToMV の粒子をそれぞれ 2433B に接種し、接種葉におけるウイルス CP 蓄積量を調査した。その結果、シロイヌナズナに感染しない BMV では、野生型 Col-0、2433B 共にシグナルが検出されず (data not shown)、シロイヌナズナに対して弱い感染性を示す CCMV では、野生型 Col-0 と 2433B でウイルス CP 蓄積に顕著な差は見られなかった (Fig. I-6B)。また、ToMV においても、2433B では野生型 Col-0 と同程度の CP 蓄積量を示した (Fig. I-6C)。このとき SBLV では、2433B における CP 蓄積は有意に低下していた (Fig. I-6A)。このことから、2433B に見られるウイルス CP 蓄積量の遅延は SBLV に特異的であることが明らかとなった。

I-4. 考察

本研究では、EMS 処理によって突然変異誘起処理を施したシロイヌナズナの M2 植物の中から、SBLV 増殖を阻害する変異株、2433B を単離した。遺伝学的解析の結果、2433B に見られる SBLV 感染の遅延は核支配の劣性形質であることが明らかとなった。このことから、2433B において SBLV は何らかの抵抗性の影響を受けているというよりは、SBLV の感染に必要な宿主因子の機能が破壊されているのではないかと考えられる。

2433B では、野生型 Col-0 と比較して SBLV 接種後の CP 蓄積に遅延が認められるが、その蓄積は完全には阻害されず、接種 6 日後には接種葉や花茎葉において野生型 Col-0 とほぼ同量の蓄積を示していた。このように 2433B において SBLV の蓄積が完全に抑えられない原因の一つに、2433B では宿主遺伝子が完全に破壊されていない可能性が考えられる。EMS 処理による変異は主に点変異であるため、挿入された変異によって遺伝子が完全に破壊されない可能性が大きい。また、別の可能性として、2433B で破壊されている宿主因子と似た機能を持つパラログが存在することが考えられる。シロイヌナズナでは、約 65% の遺伝子がパラログを持つことが明らかになっている (佐藤・田畑, 2001)。実際に、TMV-Cg の複製に必要な宿主因子として同定された *TOM1* 遺伝子には、そのパラログである *TOM3* 遺伝子が存在し、*tom1* 変異体では *TOM3* 遺伝子が TMV-Cg の増殖を助けていたために TMV-Cg の蓄積が完全に抑制されなかったことが報告されている (Yamanaka *et al.*, 2002)。それ以外の可能性としては、2433B で変異が生じた宿主因子は SBLV の増殖レベルを高める「エンハンサー」として機能していることが挙げられる。今後 2433B で SBLV 蓄積に影響を与えている原因遺伝子の同定によって、これらの仮説の検証が必要であろう。

Cauliflower mosaic virus (CaMV) に関する研究では、開花時期の早いアクセッションは開花時期の遅いアクセッションに比べて CaMV 感染性が低下するということが報告されている (Leisner and Howell, 1992; Leisner *et al.*, 1993)。2433B では花茎組織の伸長する時期が野生型 Col-0 に比べて早い様子が観察されたことから、2433B において SBLV 感染が遅延する原因が、成長速度の差によるものである可能性も考えられる。しかし、2433B では CCMV や ToMV に対してはウイルス感染に影響を与えず、SBLV 特異的にウイルス感染を遅延させることが明らかとなった。こうしたウイルス特異性から、2433B における SBLV 感染は植物の成長速度といった非特異的な要因とは異なる要因による影響を受けていると考えられる。

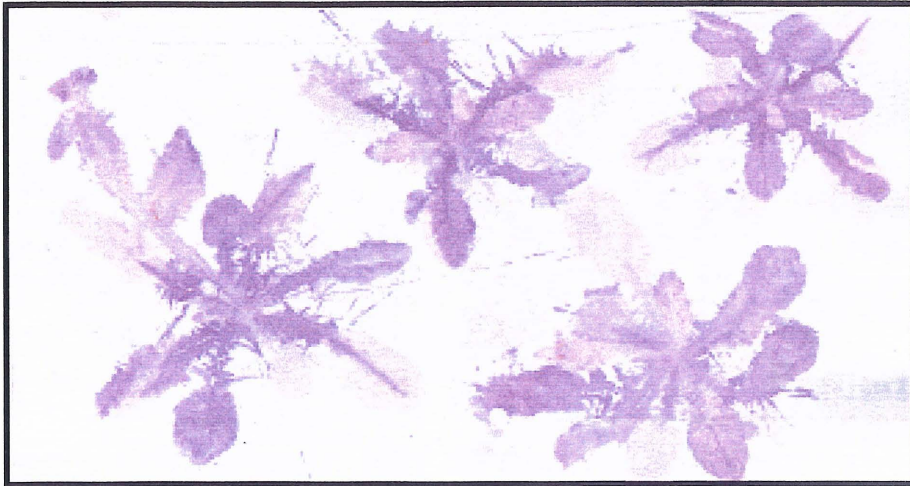
2433B 植物体における SBLV 感染の遅延は、接種葉の段階から認められた。しかし、2433B における 1 細胞レベルにおけるウイルス増殖は、野生型 Col-0 と同程度であった。このことから、2433B における SBLV 感染の遅延は、細胞

間移行のレベルで決定されていると考えられた。これまでの研究から、プロモウイルスの細胞間移行に関する知見がいくつか得られてきている。プロモウイルスの 3a タンパク質は細胞間移行において必須であり (Mise and Ahlquist, 1995; Schmitz and Rao, 1996)、BMV 3a タンパク質が核酸結合能を持つことや、原形質連絡に局在することが報告されている (Fujita *et al.*, 1998, 1999)。現在のところ SBLV における 3a タンパク質の機能は明らかにされていないが、他のプロモウイルスとの相同性から (Fujisaki *et al.*, 2003)、恐らく類似した機能を持つと考えられる。これまでに、CMV-Y の細胞間移行に影響を与えるシロイヌナズナの変異体 *cum1* および *cum2* が報告されており (Yoshii *et al.*, 1998a, 1998b)、さらなる研究から、*cum1* および *cum2* 変異体では CMV-Y 感染において 3a 移行タンパク質の翻訳が影響を受けていることが明らかとなっている (吉井・石川、私信)。このことから、今後 2433B における SBLV RNA の翻訳活性を調査する必要があるだろう。2433B において SBLV の感染が低下するメカニズムを解明し、原因遺伝子を同定することは、プロモウイルスの細胞間移行に関する新たな知見をもたらすであろうと期待される。



Fig. 1-1. Distribution of coat protein (CP) in SBLV-inoculated Col-0 and 2433B plants. Col-0 (above) and 2433B (bottom) plants were inoculated with SBLV. At 6 days post-inoculation (dpi), leaf protein was press-blotted onto chromatography paper, and SBLV CP was detected using anti-BMV antibody which cross-reacts with SBLV CP.

Col-0



2433B

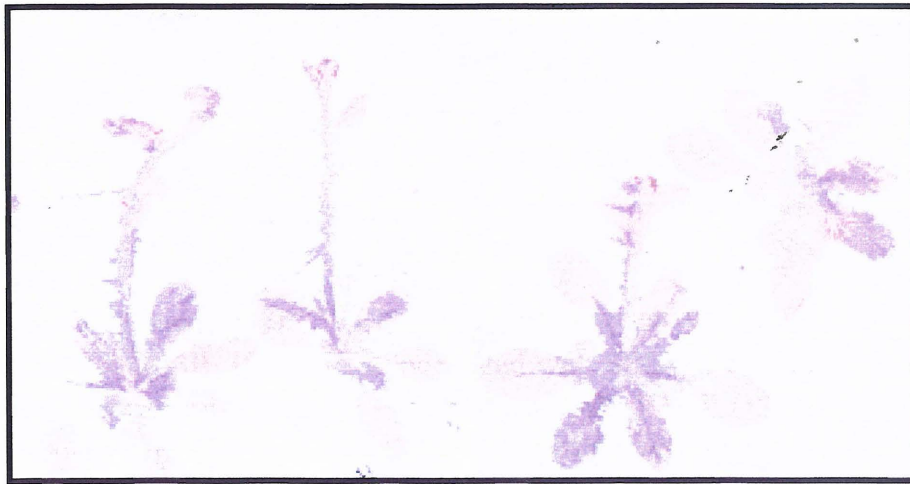


Fig. I-1. Distribution of coat protein (CP) in SBLV-inoculated Col-0 and 2433B plants. Col-0 (above) and 2433B (bottom) plants were inoculated with SBLV. At 6 days post-inoculation (dpi), leaf protein was press-blotted onto chromatography paper, and SBLV CP was detected using anti-BMV antibody which cross-reacts with SBLV CP.

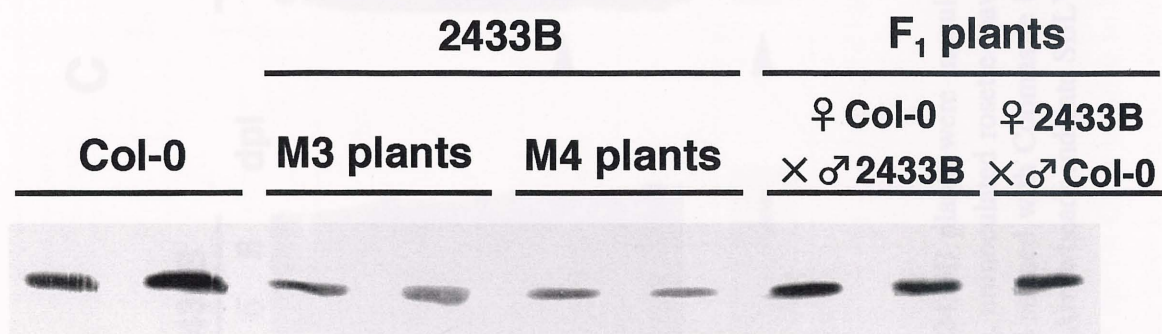
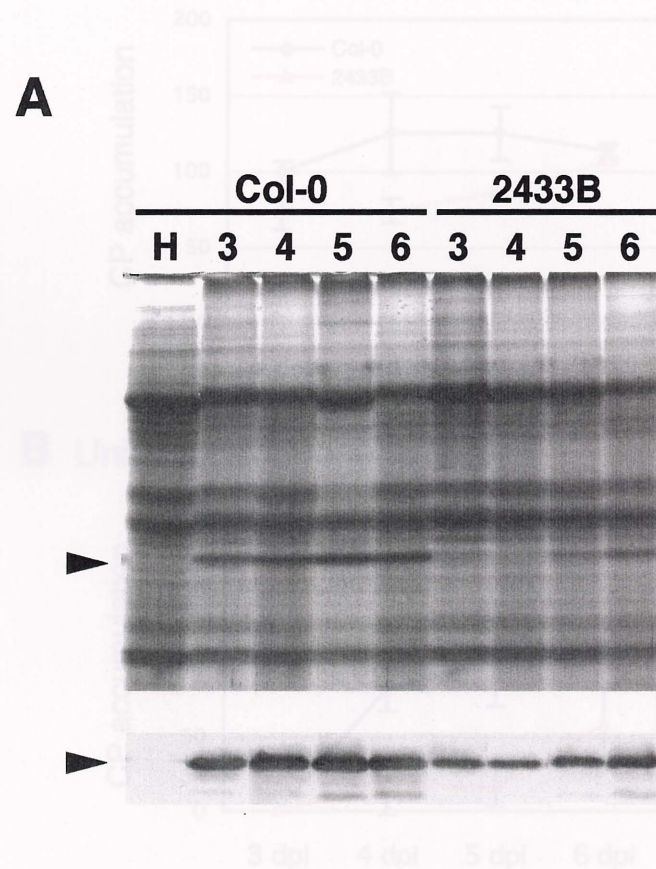
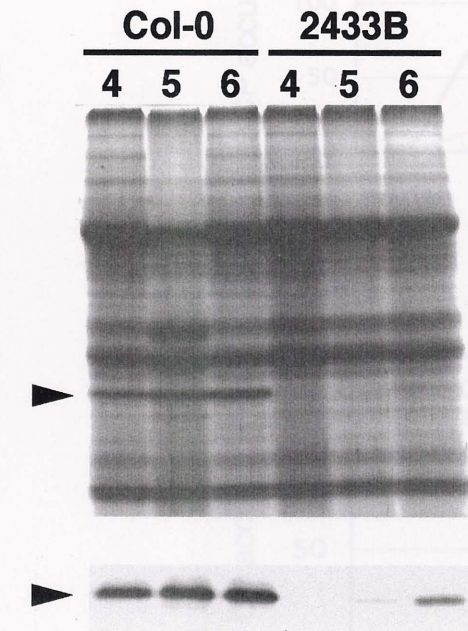


Fig. I-2. Accumulation of SBLV CP in inoculated leaves of Col-0, 2433B and F₁ plants of Col-0×2433B. Plants were inoculated with SBLV. Total proteins prepared at 3 dpi from inoculated leaves, were separated by SDS-PAGE (12.5% gel) and then transferred to a nylon membrane. SBLV CP was immunologically detected.

A Inoculated leaves



B



C

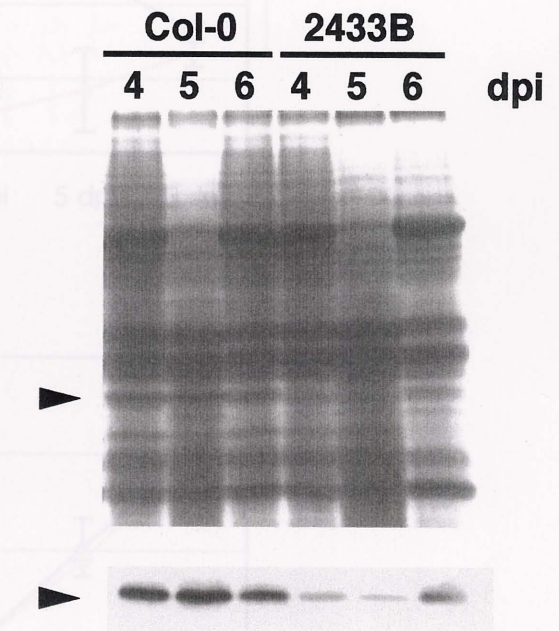
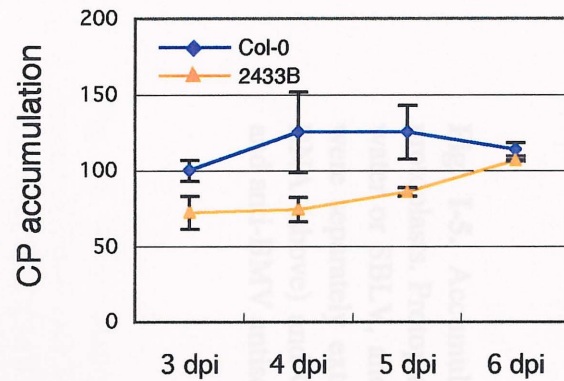
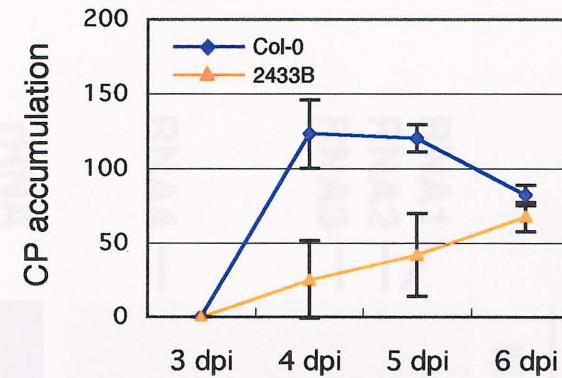


Fig. 1-3. Accumulation of SBLV CP in Col-0 and 2433B plants. Col-0 and 2433B plants were inoculated with SBLV. Leaves were harvested at various dpi and dissected into three parts: inoculated leaves (A), uninoculated rosette leaves (B) and cauline leaves (C). Total proteins from each part were separated by SDS-PAGE (12.5% gel) and stained with Coomassie brilliant blue R-250 (above) or subjected to immunological detection of SBLV CP (bottom). H=healthy plant. Arrowheads indicate SBLV CP. The mean value and standard deviations were calculated from three to four independent experiments.

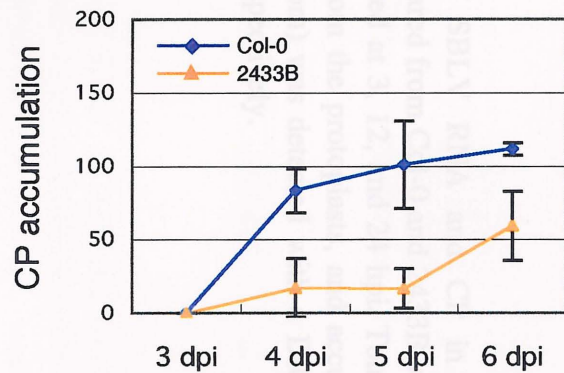
A Inoculated leaves



C Cauline leaves



B Uninoculated rosette leaves



D Protoplasts

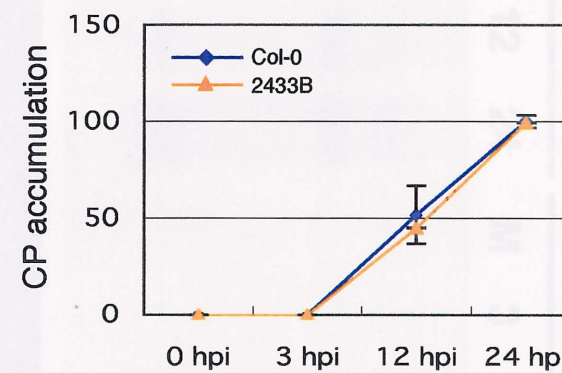


Fig. I-4. Time course of SBLV CP accumulation in wt Col-0 and 2433B plants or protoplasts. Plants were inoculated with SBLV virion, and harvested at 3, 4, 5 and 6 dpi. Harvested plants were dissected into three parts: inoculated leaves (A), uninoculated rosette leaves (B) and cauline leaves (C). Moreover, protoplasts inoculated with SBLV transcripts were harvested at 3, 12 and 24 hours post inoculation (hpi) (D). Accumulation of SBLV CP in each sample was detected by western blot analysis and quantified by NIH image program. Average values for SBLV CP accumulation relative to that in inoculated leaves of wt Col-0 at 3 dpi (A-C) or relative to that in wt Col-0 protoplasts at 24 hpi (D) are indicated. The mean value and standard deviations were calculated from three to four independent experiments.

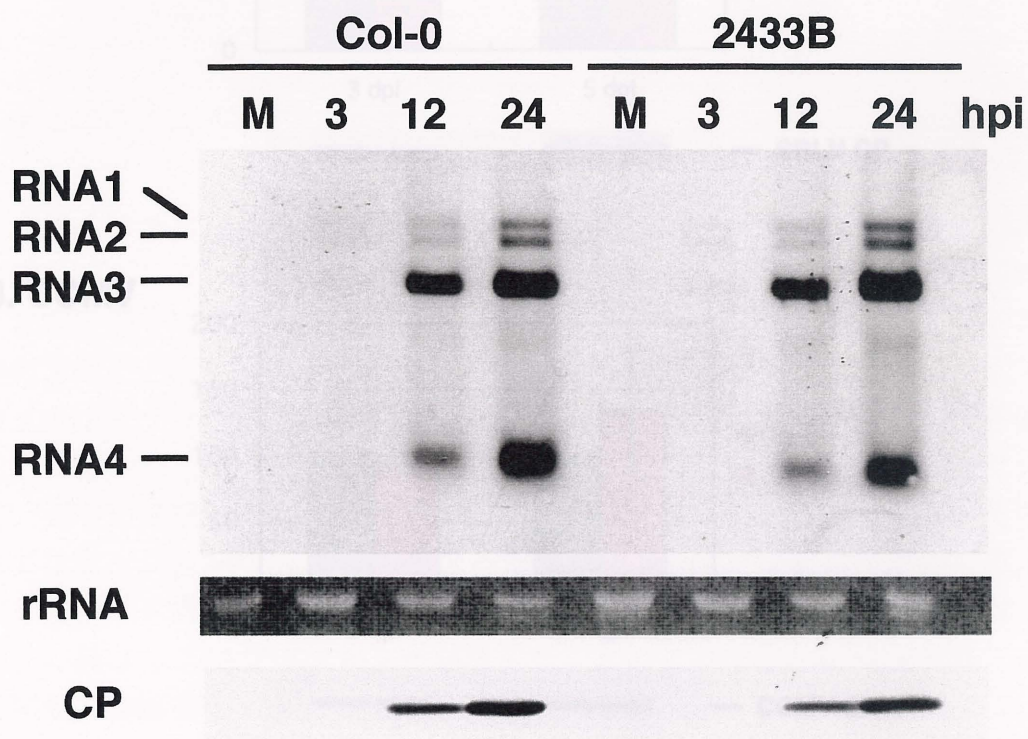
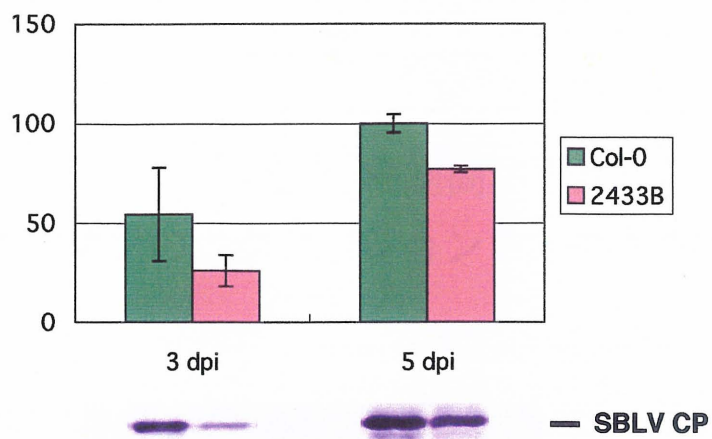


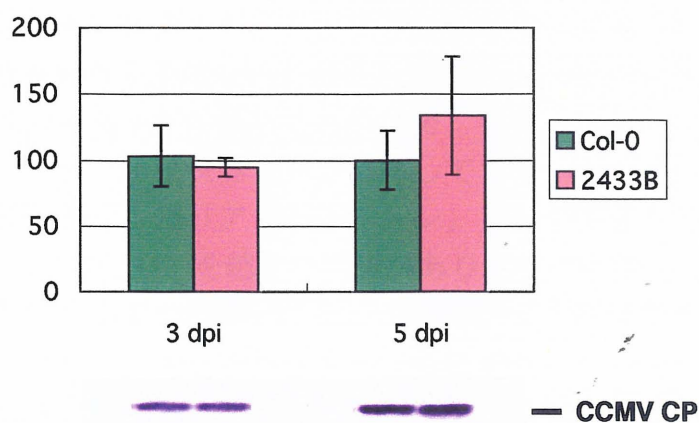
Fig. I-5. Accumulation of SBLV RNA and CP in Col-0 and 2433B protoplasts. Protoplasts prepared from Col-0 and 2433B were inoculated with water or SBLV, and harvested at 3, 12, and 24 hpi. Total RNA and protein were separately extracted from the protoplasts, and accumulation of SBLV RNA (above) and CP (bottom) was detected with a DIG-labeled riboprobe and anti-BMV antiserum, respectively.

Fig. I-6. Accumulation of CPs of SBLV, CCMV and ToMV in inoculated leaves of Col-0 and 2433B plants. Col-0 and 2433B plants were inoculated with SBLV, CCMV and ToMV. At 3 and 5 dpi, total proteins were prepared from inoculated leaves, and separated by SDS-PAGE (12.5% gel). SBLV, CCMV and ToMV CP was immunologically detected using anti-BMV (SBLV and CCMV), or anti-ToMV (ToMV) antiserum.

A. SBLV



B. CCMV



C. ToMV

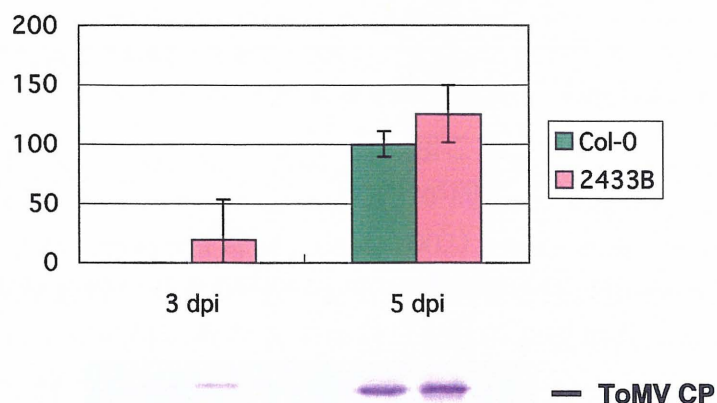


Fig. I-6. Accumulation of CPs of SBLV, CCMV and ToMV in inoculated leaves of Col-0 and 2433B plants. Col-0 and 2433B plants were inoculated with SBLV, CCMV and ToMV. At 3 and 5 dpi, total proteins were prepared from inoculated leaves, and separated by SDS-PAGE (12.5% gel). SBLV, CCMV and ToMV CP was immunologically detected using anti-BMV (SBLV and CCMV) or anti-ToMV (ToMV) antiserum.

第2章

Spring beauty latent virus の細胞間移行が遅延する シロイヌナズナのアクセション Pla-0 の同定

II-1. 緒言

植物ウイルスが宿主に全身感染する際には、様々なウイルス因子と宿主側の因子が関わっている。植物ウイルスの感染機構を解明するためには感染に関わる様々な宿主因子を単離・同定する必要がある、分子遺伝学的手法によりそれらを探索することは有効な手段の一つである。

シロイヌナズナは分子遺伝学的解析を行う上で、優れた実験材料として評価されている。シロイヌナズナは世界各地に分布しており、それぞれの環境に適応して、固有の形態に進化した「アクセション」として生育している。そのようなアクセションには 350 を越える種類があり、その中には特定の病原体に対する感受性を異にするものが存在する。これまでに、植物ウイルスに対して感染性の異なるアクセションを単離することにより、その植物ウイルスの感染に関与する宿主因子がいくつか報告されている。TEV に関する研究では、全身感染性が異なる 2 つのアクセションを用いることにより、HR や全身獲得抵抗性とは異なる抵抗性に関与する *RTM1* 遺伝子が報告された (Mahajan *et al.*, 1998)。クローニングの結果、*RTM1* タンパク質は病原体や害虫に対する防御に関わる jacalin repeat domain family に属していることが明らかとなり、師管内および伴細胞に局在することなどが示されている (Chisholm *et al.*, 2000; 2001)。また、TCV および CMV-Y に HR を引き起こすアクセションを選抜することにより、抵抗性遺伝子 *HRT* および *RCY1* が同定された (Dempsey *et al.*, 1997; Cooley *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 1994, 2002)。*HRT* と *RCY1* は対立遺伝子であり、高い類似性を持つことが分かっている。さらに、TMV に関する研究では、TMV に対して感染性の異なるアクセションを選抜し、TMV の細胞間移行や病徴発現に関わる宿主因子の探索が行われている (Dardick *et al.*, 2000)。このように、シロイヌナズナのアクセションを用いて植物ウイルスの感染に関与する宿主因子を単離・同定する方法は、第 1 章で述べた変異体を用いた方法と並んで有効であると言える。しかし今までのところシロイヌナズナを用いてプロモウイルスの感染に関与する宿主因子は報告されていない。

SBLV は、シロイヌナズナのアクセション Col-0 に全身感染するプロモウイルスであることが示されたことから (Fujisaki *et al.*, 2003a)、SBLV の感染に関与する宿主因子を、シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的手法により単離す

ることが可能となった。そこで本研究では、SBLV の感染に関与する宿主因子を、シロイヌナズナのアクセッション間における感染性の違いを利用して単離することを試みた。67 種類のアクセッションにおける SBLV の感染性を調査したところ、Playa de Aro-0 (Pla-0) における SBLV 感染が Col-0 と比べて遅延することが明らかとなった。Pla-0 における SBLV 感染性を詳細に調査した結果、SBLV は細胞間移行の段階で影響を受けていることが明らかとなった。また、遺伝学的解析の結果、Pla-0 における SBLV 感染の低下は、劣性あるいは不完全優性の形質により支配されていることが示された。

II-2. 材料と方法

植物体の育成

シロイヌナズナの子種は、オハイオ州立大学 Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) の Randall Scholl 博士より提供されたものを使用した。育成方法は第 1 章を参照。

ウイルス 粒子の植物体への接種

SBLV 粒子は第 1 章と同様にして精製し、用いた。TMV-Cg 粒子は北海道大学 農学研究科 分子生物学研究室の 石川 雅之 博士より提供されたものを使用した。

シロイヌナズナへのウイルス粒子の接種は、播種約 4 週間後の、ロゼッタ葉が完全に展開し、花茎の芽が認められた個体に行った。接種濃度は、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、ガスバーナーで先端を曲げたパスツールピペットを用いて、カーボランダムをふりかけた葉に接種した。接種葉には大きく展開した 2 枚のロゼッタ葉を選んだ。

プロトプラストの調製とウイルス接種

第 1 章と同様にシロイヌナズナのプロトプラストを調製した。分離したプロトプラストは 1 接種区あたり $1.0 \sim 5.0 \times 10^5$ 個となるように分注し、SBLV 転写物 (RNA1、2、3 全体で 6.0 μg) あるいは TMV-Cg 粒子 (10 μg) を接種した。プロトプラストへのウイルス接種および total RNA の抽出は Kroner and Ahlquist (1992) の方法に従った。

ウイルス感染の検出

ウイルス RNA の検出は、第 1 章に記した通り、ノーザンブロッティング法により行った。ウイルス RNA の検出には Dig-UTP (Roche Diagnostics K.K.) でラベルしたリボプローブを用いた。プローブ調整用の鋳型は、SBLV RNA1、2

RNA3 は第 1 章に記したものを、TMV-Cg は *EcoRI* で切断した pCgP2 (Ishikawa *et al.*, 1993) を用いた。

ウイルス CP の分布の検出は、第 1 章に記した通り、ハンマーブロッティング法により行った。ブロモウイルス CP の検出はウサギ由来の抗 BMV 抗血清 (PVAS-178, ATCC) を用いた。また、TMV-Cg CP および CMV-Y CP の検出にはウサギ由来の抗 TMV-Cg 抗血清 (Ishikawa *et al.*, 1993) および抗 CMV-Y 抗血清 (Nagano *et al.*, 1999) をそれぞれ用いた。

遺伝学的解析

Col-0 と Pla-0 を交配して得た F_1 を自殖させて F_2 植物を育成した。 F_2 植物の中から開花時期の早い個体を 10 個体選抜し、それらをさらに自殖させて F_3 植物を育成し、SBLV 感染性を調査したところ、1 ライン (PC7) が SBLV に対して低い感染性を示した。PC7 を Col-0 と戻し交雑し、得られた植物 ($7C-F_1$) の SBLV 感染性を調査した。SBLV 感染性は、SBLV CP の分布を接種 10 日後にハンマーブロッティング法で検出することにより調べた。

II-3. 結果

SBLV に対して低い感染性を示すシロイヌナズナ アクセッションの選抜

SBLV 感染に関与する宿主因子を単離するために、67 種類のアクセッションにおける SBLV の感染性を調査した (Table II-1)。SBLV は Col-0 に感染した際に無病徴であるため、SBLV の感染性は接種 14 日後にハンマーブロッティング法により調査した。その結果、SBLV は供試したアクセッション全てに全身感染し、また、ほとんどのアクセッションにおいて、植物体全体にウイルスが拡がる様子が観察された。Hi-0 および Ws-2 といったいくつかのアクセッションでは、SBLV は全身感染するが、植物体の一部にのみウイルスシグナルが拡がっている個体が多く見られた (data not shown)。これらのアクセッションは Col-0 と比較して開花時期が早い形質を持っていた。CaMV では、今までに開花時期と感染性との関係が調べられ、開花時期の早いアクセッションの方が CaMV に対する感受性が低いという報告がなされている (Leisner and Howell, 1992; Leisner *et al.*, 1993)。SBLV がこれらのアクセッションにおいて感染効率が悪いのは、植物の成長速度が原因ではないかと考えられた。しかしながら、ある一つのアクセッション (Pla-0) においては、開花時期が遅いにも関わらず、SBLV に対して低い感受性を示した。52 個体の Pla-0 に SBLV を接種し、その感染性を調査したところ、21 個体は全身感染したが (全身感染率はおおよそ 40%)、14 個体は接種葉だけが感染し、残りの 17 個体では感染性が認められなかった。これに対して、Col-0 では 38 個体中 37 個体 (おおよそ 97%) が SBLV に対して全身

感染し、その他のアクセッションも 71-100%の個体が全身感染していた (Table II-1)。さらに Pla-0 では、SBLV に全身感染する個体においても、非接種組織におけるウイルスシグナルは植物体の一部に局在しており、植物体全体にウイルスシグナルが広がる Col-0 とは異なっていた (Fig. II-1)。このように、Pla-0 は Col-0 と比較して明らかに低い SBLV 感染性を示したが、SBLV に感染した Pla-0 では HR のような病徴は観察されず、植物側の抵抗性反応は確認されなかった (Fig. II-2B)。

次に Col-0 と Pla-0 における SBLV の感染性の違いを詳細に調査するために、SBLV の拡がりを経時的に調査した。Col-0 と Pla-0 の植物体に SBLV 粒子を接種し、接種 2、4、7、10 日後の接種葉と非接種組織をそれぞれハンマーブロッキング法に供して SBLV CP シグナルの分布を検出した。その結果、Col-0 の非接種組織では、接種 4 日後に初めてウイルスシグナルが検出され、接種 7 日後には植物体全体にシグナルが広がる様子が観察された。一方、Pla-0 の非接種組織では、接種 7 日後に初めてウイルスシグナルが観察され、接種 10 日後になってもシグナルはあまり拡大していかなかった (Fig. II-3A)。このような SBLV の感染拡大の遅延は、接種葉においても観察された (Fig. II-3B)。

Pla-0 における感染性遅延のウイルス特異性

様々なウイルスの Pla-0 に対する感染性を調査した。TMV-Cg と CMV-Y はプロモウイルスと同様にアルファ様ウイルスに属し、Col-0 に効率よく全身感染することが報告されている (Ishikawa *et al.*, 1991; Takahashi *et al.*, 1994)。TMV-Cg、CMV-Y および SBLV の粒子を Col-0 と Pla-0 に接種し、接種 10 日後におけるウイルス感染をハンマーブロッキング法により調査した。Col-0 では、3 種のウイルス全てが植物体全体に拡がっている様子が観察された。一方 Pla-0 では、SBLV 感染は接種葉と非接種上位葉の一部のみに認められたが、TMV-Cg と CMV-Y は Col-0 と同様に植物体全体にウイルスが拡がっていた (Fig. II-4)。TMV-Cg については、接種 7 日後におけるウイルス感染も調査したが、Col-0 と Pla-0 共に CP シグナルは完全に拡がっておらず、感染拡大の速度は両者において同程度であった (data not shown)。以上のことから、Pla-0 に見られるウイルス感染性の低下は、SBLV に特異的であることが明らかとなった。さらに、他のプロモウイルスである BMV と CCMV についても感染性を調べたところ、Col-0 に感染しない BMV は Pla-0 に対しても感染性を示さず、Col-0 に感染性の弱い CCMV は Pla-0 に対しても弱い感染性を示すなど、これら両ウイルスは Col-0 と Pla-0 との間で感染性に顕著な差は認められなかった (Fig. II-4)。

Pla-0 プロトプラストにおける SBLV 増殖能

Col-0 と Pla-0 において、1 細胞レベルでの SBLV 増殖能に違いがあるかを調べるために、Col-0 と Pla-0 のプロトプラストに SBLV 転写物を接種し、接種 3、

12 および 24 時間後における SBLV RNA と CP の蓄積量を調査した。コントロールとして、Col-0 と Pla-0 で同様に効率良く全身感染する TMV-Cg (Fig. II-4) も接種に用いた。ウイルス RNA と CP の蓄積量はそれぞれノーザンブロットィング法およびウエスタンブロットィング法により検出した。その結果、Col-0 と Pla-0 のプロトプラストにおける SBLV RNA と CP の蓄積量に、顕著な差は見られなかった (Fig. II-5)。TMV-Cg に関しても Col-0 と Pla-0 において同程度の RNA 蓄積を示していることから、この結果は植物体におけるウイルス接種の効率や実験条件の適性の違いによるものではなく、SBLV の増殖能を反映していると考えられる。以上のことから、SBLV は Col-0 と Pla-0 のプロトプラストにおいて同程度に増殖することが明らかとなり、Pla-0 における SBLV 感染は、1 細胞レベルにおけるウイルス増殖ではなく、細胞間移行の段階で影響を受けていることが示唆された。

遺伝学的解析

Col-0 と Pla-0 間において SBLV 感染性の違いを決定している遺伝学的要因を明らかにするために、Col-0 と Pla-0 を交配して遺伝学的解析を行った。Pla-0 は Col-0 と比較して開花時期が遅いが (Col-0 では播種 3~4 週間後であるのに対し、Pla-0 では播種 6~7 週間後)、両者の交配で得た F_1 植物は播種 3 ヶ月後に親植物よりも極端に遅れて開花した。また、 F_2 植物は開花時期が個体間で大きく異なっていた。このような生育速度の違いから、 F_1 および F_2 植物において SBLV 感染性の表現型を評価するのは困難であった。そこで、 F_2 植物の中から、Col-0 と同様に開花時期の早い個体を 10 個体選抜し、それぞれを自殖させて F_3 ラインを作出した。このような 10 ラインそれぞれにつき 20~30 個体を育成し、SBLV を接種してその感染性を調査した。10 ラインの中から、最も SBLV に抵抗性を示すライン、PC7 を選抜した。PC7 ラインは Col-0 と同等の時期に開花し、全ての個体で SBLV 感染の遅延が観察された (Fig. II-6)。そこで PC7 を親植物として Col-0 と戻し交雑を行い、7C- F_1 世代を得た。7C- F_1 世代は SBLV に効率良く感染しており、その感染性は Col-0 と同程度あるいは Col-0 と PC7 の中間の表現型であった (Fig. II-6)。この結果、PC7 の持つ SBLV の感染が遅延する形質は劣性あるいは不完全優性であり、PC7 はこの形質をホモに持つことが明らかになった。

II-4. 考察

本研究では、67 種類のシロイヌナズナのアクセッションにおける SBLV 感染性を調査することにより、SBLV 感染が Col-0 と比較して遅延するアクセッション Pla-0 を同定した。Pla-0 における SBLV 感染の遅延は、接種葉における感

染拡大の段階から認められたが、プロトプラストにおける SBLV の増殖能は Pla-0 と Col-0 の間に顕著な差が認められなかった。このことから、Pla-0 における SBLV 感染は、細胞間移行の段階で影響を受けていると考えられた。

これまで、シロイヌナズナのアクセッションを用いた研究では、主にウイルス抵抗性に関与する優性の宿主因子が単離されてきた。HR 抵抗性に関わる優性の遺伝子としては、*HRT* や *RCY1* が同定されている (Dempsey *et al.*, 1997; Cooley *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 1994; 2002)。HR が起こる場合、局部壊死病斑の形成や *PR* 遺伝子発現の誘導が認められるが (Glazebrook, 2001)、SBLV を接種した Pla-0 の接種葉では局部壊死病斑が観察されず、また、Col-0 と Pla-0 との間で *PR-1* 遺伝子の発現レベルに差は認められなかった (後藤・三瀬、私信)。また、HR や全身獲得抵抗性とは異なるウイルス抵抗性に関わる遺伝子として、TEV の長距離移行を抑制する優性の遺伝子である *RTM1* が同定されている (Mahajan *et al.*, 1998; Chisholm *et al.*, 2000)。Pla-0 は SBLV の細胞間移行を抑制しており、その形質は劣性あるいは不完全優性であるため、Pla-0 における SBLV 感染の抑制は、こうした既知の抵抗性とは異なる機構で成立しているのかもしれない。

一方、シロイヌナズナのアクセッションを用いて、劣性の抵抗性因子も報告されている。TMV や *Beet curly top virus* (BCTV) に関する研究では、ウイルスの移行が抑制されているアクセッションが同定され、その抵抗性が劣性の単一遺伝子により支配されることが示されている (Dardick *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1994)。これらの劣性の宿主因子は現在のところ同定には至っておらず、遺伝子の機能などは不明である。しかし、ウイルス感染が劣性の形質によって抑制されている場合、積極的にウイルス感染を阻害する防御反応がおきているというよりは、ウイルス感染に必要な宿主因子の機能に何らかの欠損があるのではないかと考えられる。最近、*Potato virus Y* (PVY) に対して感受性の異なるトウガラシの品種を用いた遺伝学的解析により、PVY の感染に関与する劣性の宿主因子 *pvr2* が同定され、翻訳開始因子 eIF4E をコードしていることが明らかとなった (Ruffel *et al.*, 2002)。また、CMV-Y の細胞間移行に関わる宿主因子として、*CUM1* および *CUM2* が報告されているが (Yoshii *et al.*, 1998a, 1998b)、最近の研究から、*CUM1* および *CUM2* はそれぞれ翻訳開始因子 eIF4E および eIF4G をコードしていることが分かっている (吉井・石川、私信)。Pla-0 における SBLV の細胞間移行の遅延は劣性あるいは不完全優性の形質により支配されており、Pla-0 においても翻訳開始因子が関与している可能性は排除できない。今後は Col-0 と Pla-0 において SBLV RNA の翻訳活性に違いがあるのかを調査していく必要がある。

Pla-0 では SBLV 感染を積極的に阻害する抵抗性反応が起きているのか、あるいは SBLV の感染に必要な宿主因子の機能に欠損があるのか、現時点では不明である。Col-0 と Pla-0 における SBLV 感染性の違いを決定している宿主因子の

同定および機能解析により、どちらの機構によるものなのかが明らかとなり、
 ブロモウイルスの細胞間移行のメカニズムに関する新たな知見が得られるであ
 ろう。

Table II-1. Susceptibility of *Arabidopsis* accessions to SBELV

Systemically infected plants	<i>Arabidopsis</i> accessions
50 to 100%	Abd-0, Ag-0, Ak-1, Ang-0, Bay-0, Be-0, Berkley, Bla2, Bs-1, Boch-0, C24, Chi-0, Co, Col-0, Condara, Da, Db-0, Di-G, Dra-0, Ei-2, En-0, ENF, Er, EST, Fe-1, Fl-1, Fr-2, Ga-0, Gd-1, Hi-0, Hi, Hodja-Obi-Garm, Jm-0, Kl- 0, Ler, Li-5, LIN, Liliya, Mh-0, Nd-1, No-0, Nik-0, Nw-0, Ob-0, Old-1, Oy-1, Pa-1, Peterhof, Pi-0, RLD-1, Rubenae-1, S96, Sg- 1, Shardara, Sn, Sorbo, Tol-0, Tm-1, Tu-0, Wc-1, Wei-0, Wll-1, Wt-1, Wu-0
71 to 79%	Hi-0, Ws-2
40%	Pla-0

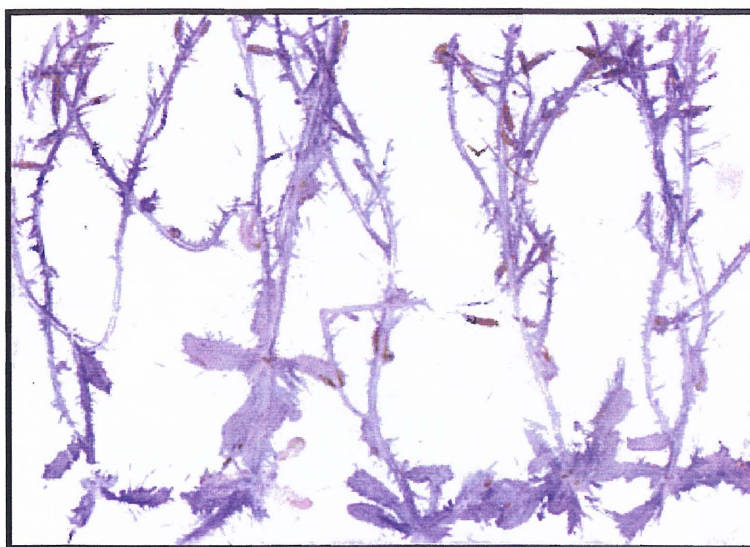
Plants were harvested at 14 dpi, and systemic infectivity of SBELV was examined by
 press blot analysis.

Table II-1. Susceptibility of *Arabidopsis* accessions to SBLV

Systemically infected plants	<i>Arabidopsis</i> accessions
80 to 100%	Abd-0, Ag-0, Ak-1, Ang-0, Bay-0, Be-0, Berkley, Bla2, Bs-1, Bscl-0, C24, Chi-0, Co, Col-0, Condara, Da, Db-0, Di-G, Dra-0, Ei-2, En-D, ENF, Er, EST, Fe-1, Fi-1, Fr-2, Ga-0, Gd-1, Hi-0, Hl, Hodja-Obi-Garm, Jm-0, Kl-0, Ler, Li-5, LIN, Litva, Mh-0, Nd-1, No-0, Nok-0, Nw-0, Ob-0, Old-1, Oy-1, Pa-1, Petergof, Pi-0, RLD-1, Rubežnoe-1, S96, Sg-1, Shardara, Sn, Sorbo, Tol-0, Tsu-1, Tu-0, Wc-1, Wei-0, Wil-1, Wt-1, Wu-0
71 to 79%	Hi-0, Ws-2
40%	Pla-0

Plants were harvested at 14 dpi, and systemic infectivity of SBLV was examined by press blot analysis.

Col-0 plants



Pla-0 plants

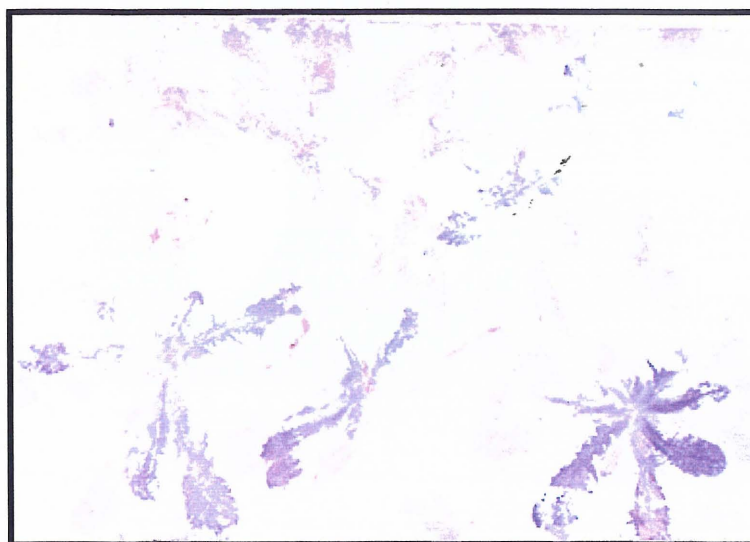


Fig. II-1. Representative data of susceptibility of Col-0 and Pla-0 to SBLV demonstrated in survey for 67 *Arabidopsis* accessions. Col-0 and Pla-0 plants were inoculated with SBLV virion at the same time (3-4 weeks after sowing). Plants were pressed onto chromatography papers at 14 dpi, and SBLV CP was immunologically detected. Because Pla-0 is late-flowering compared with Col-0, bolting tissues were not developed at the harvest time.

A



B

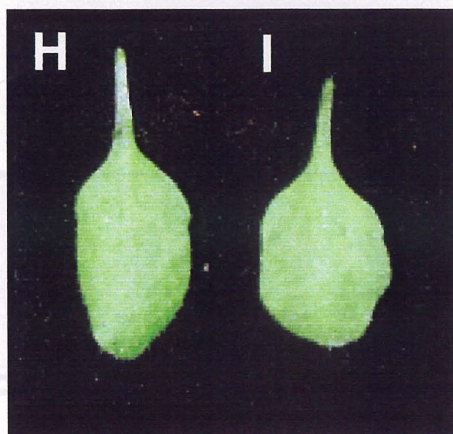


Fig. II-2. Pla-0 plants infected with SBLV. Whole plants (A) and inoculated leaves (B) were photographed at 14 dpi. **H** = healthy plant or leaf. **I** = SBLV-inoculated plant or leaf.

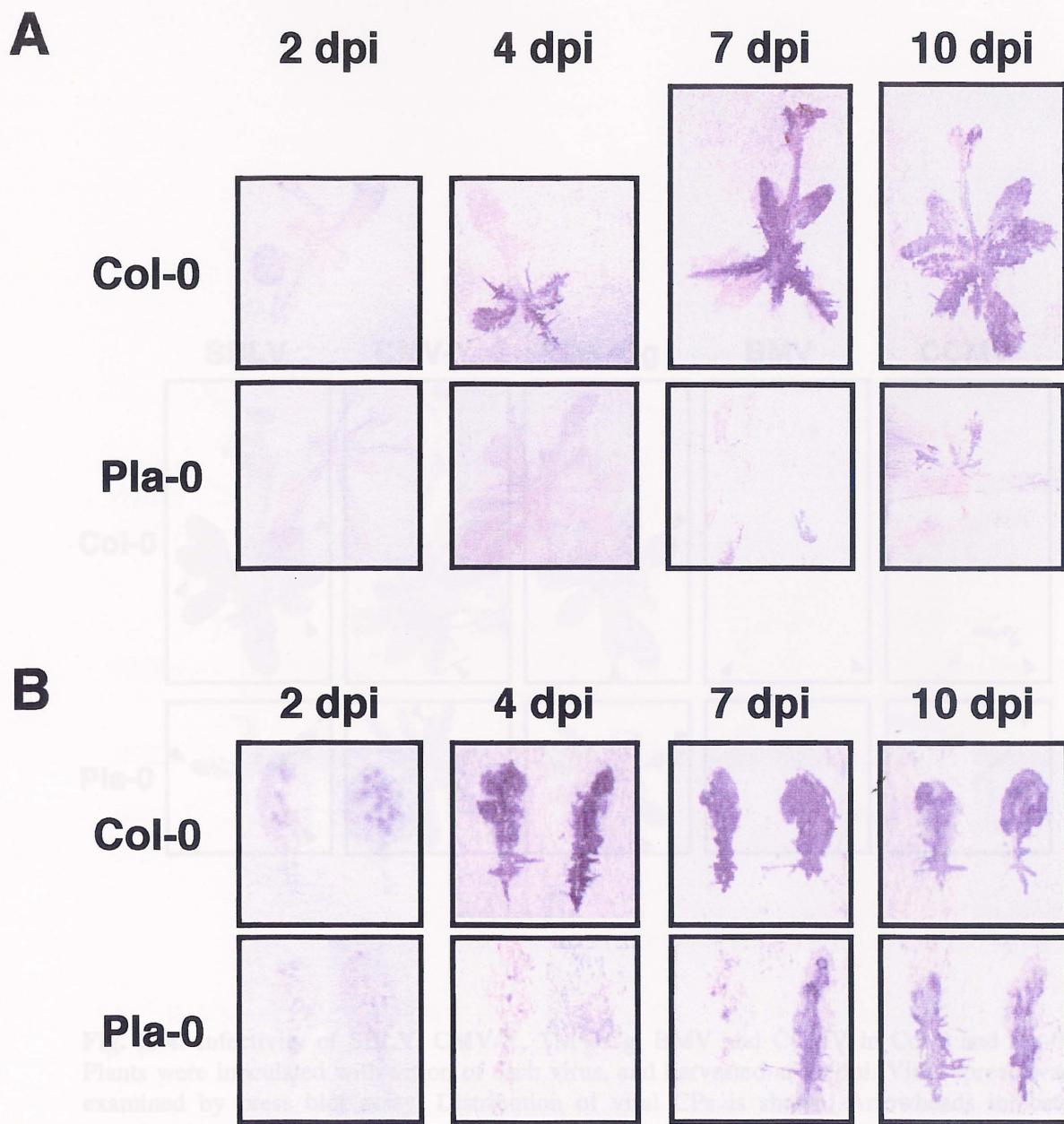


Fig. II-3. Time course for SBLV spread. Uninoculated tissues (A) and inoculated leaves (B) were pressed onto chromatography papers at 2, 4, 7, and 10 dpi. Distribution of SBLV CP was immunologically detected.

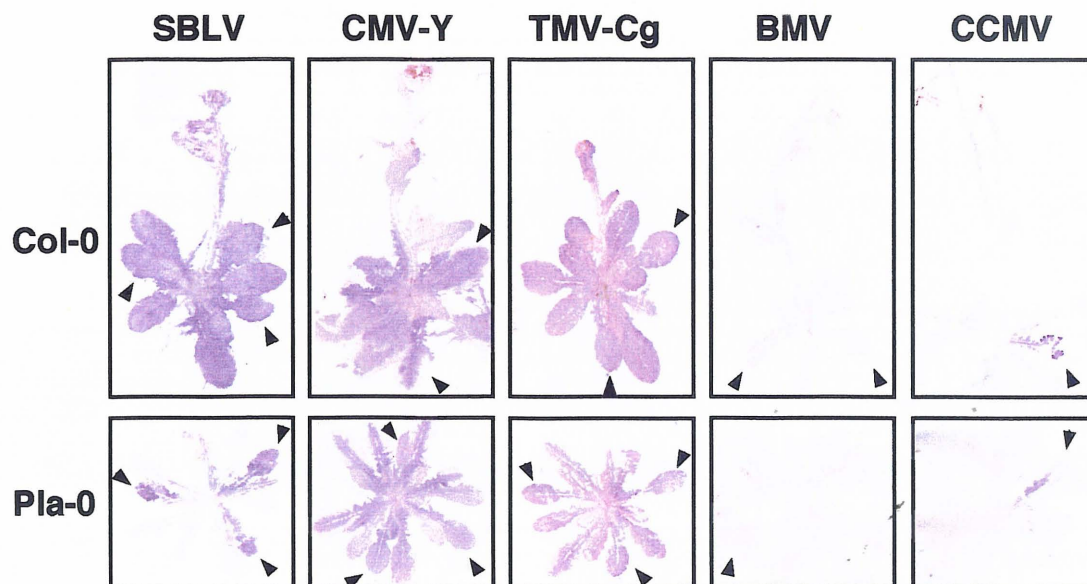


Fig. II-4. Infectivity of SBLV, CMV-Y, TMV-Cg, BMV and CCMV in Col-0 and Pla-0. Plants were inoculated with virion of each virus, and harvested at 10 dpi. Virus spread was examined by press blot assay. Distribution of viral CPs is shown. Arrowheads indicate inoculated leaves.

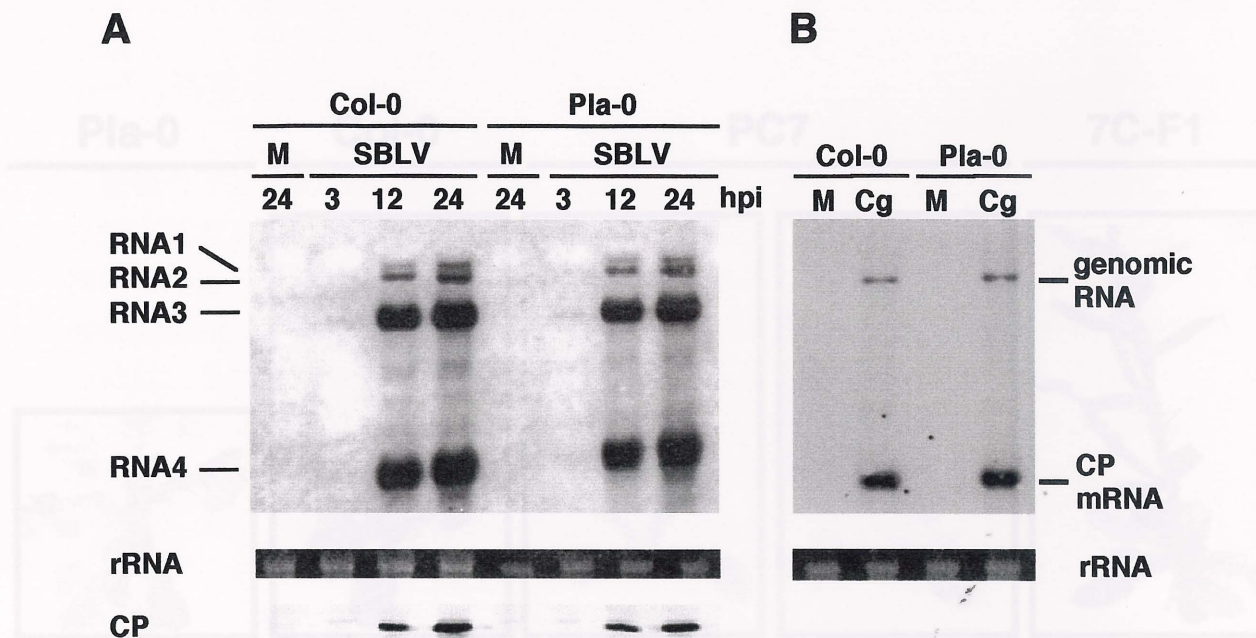


Fig. II-5. Multiplication of SBLV and TMV-Cg in Col-0 and Pla-0 protoplasts. (A) Col-0 and Pla-0 protoplasts were inoculated with SBLV virion RNAs, and total RNA and protein were extracted at 3, 12 and 24 hpi. The accumulations of SBLV RNA and CP were examined by northern and western blot analyses, respectively. SBLV RNA and CP accumulation are shown at above and bottom, respectively. Ethidium bromide-stained ribosomal RNA is indicated at the middle of each lane. Samples from protoplasts inoculated with water were also prepared at 24 hpi and are indicated by M. (B) As positive control, Col-0 and Pla-0 protoplasts were also inoculated with TMV-Cg virion. Total RNA was extracted at 24 hpi, and loaded (indicated by Cg) with that of mock-inoculated protoplasts. Positions of viral RNAs are indicated.

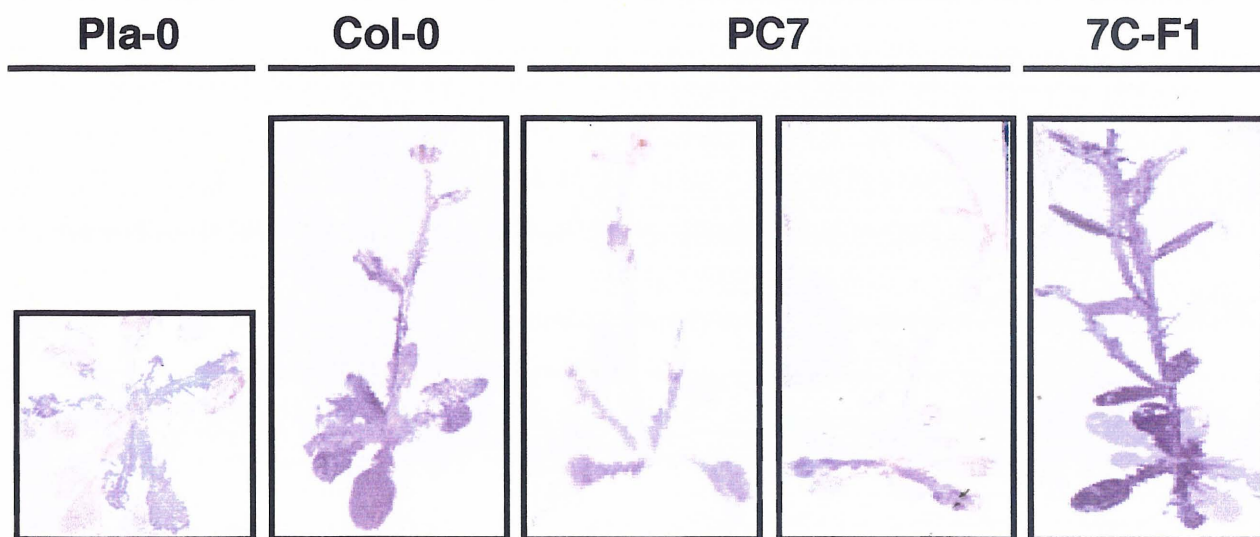


Fig. II-6. Genetic trait of Pla-0 in slower spread of SBLV. The line PC7 was established from F₂ population generated from the cross between Pla-0 and Col-0. 7C-F₁ population was generated by backcross between PC7 and Col-0. Plants were inoculated with SBLV virion. SBLV infection was examined by press blot assay by using anti-BMV antiserum at 10 dpi.

第3章

Spring beauty latent virus の病徴発現に關与する シロイヌナズナの遺伝子座 *SSB1* の同定

III-1. 緒言

植物ウイルスの病原性は、ウイルス側の因子と植物側の因子の相互作用により決定される。植物ウイルスが宿主植物に感染すると、多くの場合、モザイク、黄化、萎縮、え死などの様々な病徴を引き起こす。病徴発現もまたウイルス—植物間の相互作用により決定されており、病徴発現のメカニズムを解明するためには、それに関わる植物側の因子を同定する必要がある。

シロイヌナズナは、ウイルス感染に關与する因子を植物側から解析する際に広く用いられているモデル植物である。いくつかの植物ウイルスは、シロイヌナズナに感染すると病徴発現を引き起こすことが明らかになっており、アクセッションによって病徴が異なる例がいくつか報告されている。TCV は Col-0 を始め多くのアクセッションに感染するとえ死を引き起こすのに対し、Dijon では接種葉において局部え死病斑が観察され、HR が起きることが報告されており、HR に關与する遺伝子、*HRT* が同定された (Dempsey *et al.*, 1993; 1997; Cooley *et al.*, 2000; Kachroo *et al.*, 2000)。同様に、CMV-Y は Ler-0 など多くのアクセッションに対して黄化や矮化症状を引き起こすのに対し、C24 などいくつかのアクセッションでは HR が起こることが明らかとなり、HR に關与する遺伝子、*RCY1* が同定された (Takahashi *et al.*, 1994; 2002)。こうした HR の誘導は典型的な植物の抵抗性反応であり、この場合ウイルスの全身感染は抑制される。一方、*Tobacco ringspot virus* (TRSV) では Col-0 を始め多くのアクセッションにおいて全身感染するが無病徴であるのに対し、Estland や H55 といったいくつかのアクセッションに感染すると退緑症状や矮化症状を引き起こすことが示された。このように、ウイルスの感染は許容するが病徴発現は起こらないような植物の抵抗性はトレランス型抵抗性と呼ばれており、TRSV のトレランスに關与する遺伝子座、*TTR1* が Col-0 と Estland を用いて報告されている (Lee *et al.*, 1996)。

SBLV は Col-0 に対して効率良く全身感染するが、病徴は観察されないことが明らかとなっている (Fujisaki *et al.*, 2003a)。本研究では、SBLV のシロイヌナズナにおける病徴発現機構を解析するために、まず 85 種類のアクセッションについて SBLV に対する病徴を調査した。その結果、S96、Ei-2 などいくつかのアクセッションでは SBLV 感染に対して病徴を発現することが明らかとなった。S96 では 1 細胞レベルにおける SBLV 増殖や植物体における SBLV の拡

がりなどといった感染性は Col-0 と顕著な差がないことが示された。遺伝学的解析の結果、S96 における病徴発現には核内の単一遺伝子座が関与していることが明らかとなり、これを *SSB1* (Symptom development in *SBLV* infection) と名付けた。マッピング解析の結果、*SSB1* 遺伝子座は第 4 染色体上の、*SSLP* マーカー *nga1139* と *CAPS* マーカー *JM142* の間に位置することが明らかとなった。

III-2. 材料と方法

植物体の育成とウイルスの接種

シロイヌナズナの種子は、オハイオ州立大学 *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC) の Randall Scholl 博士より提供されたものを使用した。植物体の育成方法とウイルス粒子の接種は第 1 章と同様に行った。

プロトプラストの調製とウイルス接種

第 1 章と同様にシロイヌナズナのプロトプラストを調製した。分離したプロトプラストは 1 接種区あたり $1.0 \sim 5.0 \times 10^5$ 個となるように分注し、*SBLV* 転写物 (RNA1、2、3 全体で 6.0 μ g) を接種した。プロトプラストへのウイルス接種および total RNA の抽出は Kroner and Ahlquist (1992) の方法に従った。

ウイルス感染の検出

ウイルス RNA の検出は、第 1 章に記した通り、ノーザンブロットィング法により行った。また、ウイルス CP の分布の検出は、第 1 章に記した通り、ハンマーブロットィング法により行った。

遺伝学的解析

Col-0 と S96 を交配して得た F_1 および F_2 植物を育成し、*SBLV* に対する病徴を調査した。表現型の解析は、*SBLV* 粒子を植物体に接種し、接種 14 日後で病徴を観察することにより行った。病徴の出なかった個体に対しては、ハンマーブロットィング法により *SBLV* に感染していることを確認し、分離比を決定した。さらに、 χ^2 乗検定により実験値と理論値の適合度を求めた。 χ^2 乗値の計算法は以下の通りである。

$$\chi^2 = \sum \{(\text{観察値} - \text{理論値})^2 / \text{理論値}\}$$

また、 χ^2 乗検定の値から、ホームページ <http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/CGI-BIN/distribution.html> を利用して実験値が理論値をとりうる確率 (P) を求めた。

DNA 抽出法

◆CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 法

シロイヌナズナのロゼッタ葉 2 枚をエッペンチューブに採取して-80℃で凍結保存し、その後 DNA 抽出を行った。まず、200 μ l の CTAB バッファー [100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1.4 M NaCl、20 mM EDTA (pH 8.0)、3% (w/v) CTAB、0.2% 2-メルカプトエタノール] を加えて植物組織を磨砕した。さらに 300 μ l の CTAB バッファーを加え、vortex した後、60℃で 30 分間保温した。保温中は 10 分ごとに vortex を行った。その後、500 μ l のクロロホルムを加え、遠心分離 (20,000 \times g、5 分、室温) した。上清に 350 μ l のイソプロパノールを加えて遠心分離 (20,000 \times g、5 分、室温) して沈澱させ、70%エタノールで洗浄後、ペレットを室温で 10 分間放置し、乾燥させた。その後、100 μ l の TE を加えて懸濁し、-20℃で保存した。

◆簡便法 (Edwards *et al.*, 1991)

CTAB 法と同様に冷凍保存した植物組織に 200 μ l の抽出バッファー [200 mM Tris-HCl (pH 7.5)、250 mM NaCl、25 mM EDTA (pH 8.0)、0.5% SDS] を加えて磨砕し、遠心分離 (20,000 \times g、5 分、室温) した。上清に 200 μ l のイソプロパノールを加えて室温に 5 分間放置後、遠心分離 (20,000 \times g、10 分、室温) して沈澱させた。上清を捨て、ペレットを CTAB 法と同様にして乾燥させ、100 μ l の TE に懸濁後、-20℃で保存した。

サンプル数が多い場合には、Collection Microtube (QIAGEN 社) に植物組織を入れ、抽出バッファーと共に直径 3 mm のジルコニアビーズ (QIAGEN 社) 2 個を加えて Mixer Mill MM300 (QIAGEN 社) により 15 分間振動させて破碎した。以降の手順は上と同様に行った。

マッピング

CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) 法と SSLP (Simple sequence length polymorphism) 法を用いて *SSBI* 遺伝子のマッピングを行った。用いた CAPS マーカーおよび SSLP マーカー (Table. III-4) の情報はデータベース The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <http://www.arabidopsis.org/>) より入手した。

◆CAPS 法

上記の CATB 法および簡便法で抽出した DNA 溶液 100 μ l のうち、1.0~2.0 μ l を反応液 [1.0 μ l 10 \times ExTaq バッファー、0.5 μ l 2.5 mM dNTPs、0.1 μ l ExTaq、0.25 μ l 30 μ M CAPS プライマーforward、0.25 μ l 30 μ M CAPS プライマーreverse、+DW ; 全量 10 μ l] に加え、反応条件 [94℃で 4 分反応後、94℃で 30 秒、56℃ (異なるマーカーもある ; TAIR ホームページ <http://www.arabidopsis.org/> 参照) で 30 秒、72℃で 1 分を 35 サイクル繰り返した後、72℃で 7 分] で PCR を行った。その後、PCR 産物は制限酵素で切断し [10 μ l PCR 反応液、2 μ l 10 \times 制限酵素バッファー、0.5 μ l 制限酵素、+DW ; 全量 20 μ l]、2%アガロースゲルで電気泳動した。

◆SSLP 法

CAPS 法と同様の反応液を用い、反応条件 [94℃で 4 分反応後、94℃で 15 秒、56℃ (異なるマーカーもある ; TAIR ホームページ<http://www.arabidopsis.org/> 参照) 15 秒、72℃で 30 秒を 30 サイクル繰り返した後、72℃で 7 分] で PCR を行った。その後 PCR 産物は 4%アガロースゲルで電気泳動した。

◆組み換え率

Col-0 と S96 の交配により得た F₂ 植物体の中から病徴を示さない個体を選抜し、CAPS 法と SSLP 法を用いて組み換え率を求めた。SSB1 と各マーカーの間の組み換え率 (r) および組み換え率の標準偏差 (Sr) は、以下の式で求めた (Allard, 1956)。

$$r = \{(h + 2b) / 2n\} \times 100 [\%]$$

$$Sr = \{r(100-r) / 2n\}^{1/2}$$

(n = マッピングに用いた F₂ 個体数、 h = そのマーカーにおいてヘテロに組み換えを起こした F₂ 個体数、 b = そのマーカーにおいてホモに組み換えを起こした F₂ 個体数)

III-3. 結果

シロイヌナズナのアクセションにおける SBLV に対する病徴の調査

85 種類のシロイヌナズナのアクセションに SBLV 粒子を接種し、接種 14 日後に病徴を観察し、その後 SBLV 感染をハンマーブロッティング法により確認した。Col-0 は SBLV 感染に対し無病徴であり (Fig. III-1A)、その他の多くのアクセションも無病徴か、病徴を示しても非常に弱いものであった。しかし、4 つのアクセションでは激しい病徴を呈した (Table III-1)。そのうち 2 つのアクセション (S96 と Fr-2) では、SBLV に感染すると接種葉と多くの非接種ロゼッタ葉は黄化やえ死を起こし、新しく展開するロゼッタ葉は矮化を起こした (Fig. III-1B)。S96 と Fr-2 のほとんどの個体は SBLV に感染すると花茎の成長が全く認められず、まれに認められても著しい形態異常を示した。他の 2 つのアクセション (Ei-2 と Abd-0) では、SBLV に感染すると接種葉は黄化やえ死を起こし、非接種ロゼッタ葉は矮化が認められるがえ死は起こさなかった (Fig. III-1C)。Ei-2 と Abd-0 は開花時期が Col-0 などと比較して遅いため、接種 14 日後では Mock 接種個体であっても花茎組織は伸長しなかった。そこで Ei-2 と Abd-0 の花茎が伸長する時期 (播種 6~7 週間後) に合わせて SBLV を接種したところ、接種 14 日後において花茎組織の伸長が認められた個体が見られたが、その形態は S96 と同様に異常なものであった。ハンマーブロッティング法により SBLV 感染性を調査したところ、アクセションによりある程度の差はあるものの、全てのアクセションは SBLV に全身感染していた (第 2

章参照)。

病徴を発現する形質の遺伝学的解析

SBLV に対して病徴を示す 4 つのアクセッションのうち、S96 について以降の実験を行った。S96 において SBLV 感染に対して病徴が発現される形質の遺伝学的性質を決定するために、Col-0 と S96 の間で人工交配を行った。Col-0 と S96 の交配により得た F_1 植物に SBLV を接種したところ、全ての F_1 植物が親に用いた Col-0 と S96 の中間の病徴を示した。 F_1 植物では、接種葉は S96 と同様にえ死したが、非接種ロゼッタ葉は多少黄化が見られるもののえ死には至らなかった。また、 F_1 植物は花茎組織を形成して種子をつけたが、茎の成長は Col-0 より遅く、多くの個体において花茎葉や鞘に形態異常が見られた (Fig. III-2, Table III-2)。これらの結果から、S96 における病徴発現の表現型は不完全優性であることが明らかになった。次に、 F_1 植物を自殖させて得た F_2 植物に SBLV を接種し、表現型の分離比を調査した。 F_1 植物 ($\text{♀ S96} \times \text{♂ Col-0}$) に由来する 212 個体の F_2 植物では、S96 と同様に激しい病徴を示すものが 48 個体、Col-0 と同様に無病徴な個体が 54 個体、中間の病徴を示す個体が 110 個体であった (Table. III-2)。激しい病徴を示す個体：中間の病徴を示す個体：無病徴の個体の分離比はおよそ 0.9 : 2 : 1 であり、理論比 1 : 2 : 1 に近い割合で分離した。 F_1 植物 ($\text{♀ Col-0} \times \text{♂ S96}$) に由来する F_2 植物においても同様の分離比を示した (Table III-2)。これらの結果、S96 の病徴発現には核内の単一遺伝子座が関与していることが明らかになった。この遺伝子座を *SSB1* (Symptom development in SBLV infection) と名付けた。

S96 における SBLV 感染性

S96 では SBLV 感染に対して激しい病徴を引き起こすが、Col-0 と S96 との間で SBLV の感染性に差があるかどうかを調べた。Col-0 と S96 に SBLV を接種し、接種 2、4、7 日後の植物体における SBLV の分布をハンマースプロッティング法により調査した。両方の植物において、接種 4 日後に接種葉全体にウイルスが拡がると共に、非接種上位葉でウイルスシグナルが初めて観察された。そして接種 7 日後には植物体全体にウイルスが拡がっていた (Fig. III-3)。さらに、Col-0 と S96 のプロトプラストに SBLV 転写物を接種し、1 細胞レベルにおける SBLV 増殖能を調べた。接種 3、12、24 時間後にプロトプラストから total RNA を抽出し、ノーザンプロッティング法により SBLV RNA の蓄積を検出した。その結果、両植物において RNA 蓄積に顕著な差は見られなかった (Fig. III-4)。以上から、Col-0 と S96 では SBLV の 1 細胞レベルにおける増殖や移行の効率は同程度であることが明らかとなった。

SSB1 遺伝子座のマッピング

SSB1 遺伝子座のマッピングに先立ち、Col-0 と S96 において多型を示す DNA マーカーの選抜を行った。1 染色体あたり 2~6 種の CAPS マーカーあるいは SSLP マーカーについて多型を調べたところ、9 種のマーカー (ADH, AG, DHS1, GPA1.1, LFY3, nga6, nga8, nga225, nga280) が Col-0 と S96 との間で多型を示した (Table III-3)。これらのマーカーを用いて *SSB1* 遺伝子座のラフマッピングを行った。F₁ 植物 (♀S96×♂Col-0) に由来する F₂ 植物の中から、病徴を示さない個体 (Col-0 型の表現型の個体) を 10 個体選抜し、ゲノム DNA を抽出して各マーカーにおける遺伝子型を調査した。第 4 染色体上に位置する 2 つのマーカー、AG と DHS1 は、Col-0 に連鎖しており、組換え価はそれぞれ 0% および 10% であった。それ以外の 7 つのマーカーでは組換え価は 45~65% であり、連鎖は見られなかった (Table III-4)。この結果から、*SSB1* 遺伝子座は第 4 染色体上に位置することが明らかになった。

次に、第 4 染色体上の CAPS、SSLP マーカーを増設し、Col-0 と S96 との間に多型の見られた 5 種のマーカー (AG, ATMB3R, CAT2, nga1107, DHS1; Table. III-3) を用いてさらにマッピングを行った。43 個体の病徴を示さない (Col-0 型) F₂ 植物を用いて組換え価を調査したところ、AG では 16.3%、ATMYB3R では 2.3%、CAT2 では 0%、nga1107 では 2.3%、DHS では 4.9% であった。この結果、*SSB1* 遺伝子座は ATMB3R と nga1107 の間に位置することが明らかになった。2 種のマーカー間に挟み込まれたため、FIRE (fast isolation of recombinants) 法 (Kato *et al.*, 1999) を用いてより詳細なマッピングを行った。154 個体の F₂ 植物の中から ATMB3R と nga1107 の間で組み換えを起こしているものを 21 個体選抜し、ATMB3R-nga1107 間に存在する 3 種類のマーカー (nga1139, CAT2, JM142) を用いて組み換えを生じている染色体部位の絞り込みを行うと共に、各個体の SBLV に対する病徴を調べた (Fig. III-5)。その結果、*SSB1* 遺伝子座は nga1139 (15408641 bp) と JM142 (16389046 あるいは 16709638 bp) の間に位置することが明らかになった。

III-4. 考察

SBLV はシロイヌナズナに感染しても、Col-0 など多くのアクセッションにおいて無病徴の潜在感染をする。しかし本研究において、S96、Fr-2、Ei-2、Abd-0 の 4 つのアクセッションは SBLV 感染に対して病徴を発現することが明らかになった。S96 と Fr-2 では接種葉や非接種ロゼッタ葉に黄化やえ死が見られた。また、Ei-2 と Abd-0 では非接種ロゼッタ葉に矮化が認められた。S96 における病徴発現の遺伝学的性質を調査した結果、SBLV 感染に対する病徴発現に關与する不完全優性の核内単一遺伝子座、*SSB1* が第 4 染色体上に同定された。S96 における SBLV の感染性を調査したところ、1 細胞レベルにおけるウイルス増

殖能や、ウイルスの移行能は、無病徴の Col-0 と同程度であったことから、*SSBI* は SBLV の複製や細胞間移行、長距離移行といった感染過程には関与せず、病徴発現に関わることが考えられた。

S96 と Fr-2 における SBLV に対する病徴は類似したものであった。従って、Fr-2 における病徴発現も *SSBI* の対立遺伝子が関わっている可能性が考えられる。今後 S96 と Fr-2 を交配させることによりこの仮説の検証ができるであろう。一方、これらとは異なる病徴を示した Ei-2 では、遺伝学的解析の結果、病徴発現が複数の遺伝子によって支配されていることが示唆されている（藤崎、私信）。このことから、S96 と Ei-2 は異なるメカニズムにより病徴を発現している可能性が考えられる。一方で、Ei-2 の病徴発現に関わる遺伝子座の 1 つは *SSBI* であり、それとは別の遺伝子座が矮化とえ死の病徴の違いを引き起こしているのかもしれない。S96 と Ei-2 における病徴発現のメカニズムの違いを解明するためにはさらなる研究が必要である。

これまでの研究から、TRSV に対する病徴を発現するアクセッションとして Estland が単離され、トレランス型抵抗性に関与する *TTR1* 遺伝子が報告されている。また、TRSV は S96 や Ei-4 に感染しても病徴を引き起こさないことが示されている（Lee *et al.*, 1996）。一方、SBLV は Estland に対して無病徴の潜在感染をすることが明らかとなった。これらのことは、病徴発現に関与するウイルス側の因子と植物側の因子は特異的に相互作用することを示している。また、*TTR1* は不完全優性の遺伝子であり、第 5 染色体にマッピングされている。*SSBI* も不完全優性の遺伝子であるが、第 4 染色体上に位置していることから、両者は対立遺伝子ではないが、類似した機能を持ち、病徴発現に関与している可能性も考えられる。

Col-0 と S96 の間で SBLV に対する反応の違いを決定している *SSBI* の機能としては、S96 において発現された *SSBI* 遺伝子産物が機能的に働くことにより、S96 では病徴発現の反応が誘導される可能性が考えられる。シロイヌナズナの病原体に対する抵抗性経路において、病原体の認識に関わる遺伝子はアクセッションを用いた研究から同定されているが、その下流のシグナル伝達に関わる遺伝子は変異体を用いた研究からしか同定されてきておらず（Glazebrook, 2001）、下流遺伝子はアクセッションの種類によらず保存されていると考えられる。*SSBI* と SBLV が特異的に相互作用することも合わせて考えると、S96 の *SSBI* が機能的に働いている場合、*SSBI* は SBLV の認識に関与し、病徴発現のための応答を活性化しているのではないかと予想される。一方、別の可能性として、Col-0 において発現された *SSBI* 遺伝子産物が機能的に働くことにより、Col-0 では病徴発現の誘導が抑制されることが考えられる。この場合 *SSBI* は SBLV の認識の段階で阻害的に働いているのではないかと予想される。こうした可能性とは別に、Col-0 と S96 の両方において *SSBI* 遺伝子産物は植物の成長や維持に機能的に働くが、SBLV が S96 の *SSBI* 特異的にその機能を阻害し、そ

の結果 S96 では病徴が発現されるという可能性も考えられる。

これまで、植物ウイルスの防除を目的として、ウイルスの増殖を抑制する抵抗性反応の研究が精力的に行われてきた。一方で、本研究で示したようなウイルス感染による病徴発現機構に関しては、あまり知見が得られてこなかった。しかし、植物の病徴発現の制御はウイルス病を防除する有効な方法の一つであると言える。SSBI の同定および機能解析は、ウイルス感染に対する植物の病徴発現機構に関する新しい知見をもたらすと共に、植物ウイルスの防除において重要な意味を持つであろう。

Table III-1. Classification of *Arabidopsis* accessions based on their symptom phenotypes by SBLV infection

Systemically infected plants	<i>Arabidopsis</i> accessions
No or mild symptom	Aa-1, Ag-0, Ak-1, Ang-0, Bay-0, Bch-1, Be-0, Ber, Berkley, Buckhorn Pass, Bla2, Bs-1, Bschr-0, C24, Chi-0, Co, Col-0, Condara, Da, Db-0, Di-G, Dra-0, Ema-1, En-D, ENF, Er, EST, Fe-1, Fi-1, Ga-0, Ge-0, Gd-1, Gr-3, H55, Hi-0, Hl, Hodja-Obi-Garm, Is-0, Je54, Jm-0, Kl-0, Ler, Limeport, Li-5, LIN, Litva, M7884S, Ma-0, Mh-0, Nd-1, No-0, Nok-0, Np-0, Nw-0, Ob-0, Old-1, Oy-1, Pa-1, Per-1, Petergof, Pi-0, Pla-0, Po-0, RLD-1, Rubeznov-1, Santa Clara, Sg-1, Shardara, Sn, Sorbo, Ta-0, Tol-0, Ts-1, Tsu-1, Tu-0, Wei-0, Wc-1, Wil-1, Ws-2, Wt-1, Wu-0
Necrosis on systemic leaves	S96, Fr-2
Dwarf of systemic leaves	Abd-0, Ei-2

Col-0 plants were inoculated with SBLV virion at 3 to 4 weeks after sowing. Most accessions including late-flowering accession were also inoculated at the same time. Some early-flowering accessions such as Ws-2 were inoculated just before onset of development of bolting stem. Symptoms were observed at 14 dpi. Moreover, plants were harvested, and SBLV infection was checked by press blot analysis.

Table III-2. Segregation of symptom phenotype of S96 by SBLV infection

Genotype	Symptom ^a			χ^2 ^d	P
	Severe	Mild	None		
Col-0	0	0	20	-	-
S96	24	0	0	-	-
♀ S96 × ♂ Col-0 (F ₁) ^b	0	21	0	-	-
♀ Col-0 × ♂ S96 (F ₁) ^b	0	18	0	-	-
♀ S96 × ♂ Col-0 (F ₂) ^c	48	110	54	0.64	0.73
♀ Col-0 × ♂ S96 (F ₂) ^c	24	50	20	0.72	0.70

^a Plants were inoculated with SBLV virion, and scored for symptoms at 14 dpi.

^b F₁ plants from the cross between S96 and Col-0 developed symptoms intermediate between Col-0 and S96.

^c F₂ plants were obtained by allowing F₁ individuals to self-fertilize.

^d χ^2 values were calculated for an expected ratio of 1:2:1 for severe:mild: no symptoms of plants

Table III-3. SSLP and CAPS markers used in this study

Chromosome	position (cM)	SSLP ^a	CAPS ^a / Enzyme	Forward primer	Reverse primer
I	11.48	nga63		ACCCAAGTGATCGCCACC	AACCAAGGCACAGAAGCG
	12.6		NCC1 / <i>RsaI</i>	AAGTTATAAGGCATTAGAATCA TAATC	GTCCTATCTCTACGATGTGGATG
	42.17	nga248		TCTGTATCTCGGTGAATTCTCC	TACCGAACCAAAACACAAAGG
	83.83	nga280		GGCTCCATAAAAAGTGCACC	CTGATCTCACGGACAATAGTGC
	117.52		ADH / <i>XbaI</i>	AAAAATGGCAACACTTTGAC	GCGTGACCATCAAGACTAAT
II	48.9		GPA1.1 / <i>AflIII</i>	ATTCCTTGGTCTCCATCATC	GGGATTTGATGAAGGAGAAC
	73.77	nga168		GAGGACATGTATAGGAGCCTCG	TCGTCTACTGCACTGCCG
III	48.45		GL1 / <i>HinfI</i>	CCATGATCCGAAGAGACTAT	ATATTGAGTACTGCCTTTAG
	86.41	nga6		ATGGAGAAGCTTACACTGATC	TGGATTCTCTCTCTCTTCAC
	87.88	nga112		CTCTCCACCTCCTCCAGTACC	TAATCACGTGTATGCAGCTGC
IV	26.56	nga8		TGGCTTTCGTTTATAAACATCC	GAGGGCAAATCTTTATTTCGG
	29.64	nga1111		AGTTCAGATTGAGCTTTGAGC	GGGTTCGGTTACAATCGTGT
	31.44	DET1.2		GGTGAAAATGGAGGAGACGA	TTCAAACACCAATATCAGGCC
	57.64		G4539 / <i>HindIII</i>	GGACGTAGAATCTGAGAGCTC	GGTCATCCGTTCCCAGGTAAAG
	63.16		AG / <i>XbaI</i>	CAAACACCATTTAATCTTGACA	CAACAGGTTTCTTCTTCTCTC
	75.16		PG11 / <i>BfaI</i>	AGTGAAATTCACCAGCATG	CGCAACTAACCACACATTAC
	75.69		RPS2 / <i>Sau3AI</i>	TTCGACGGATGGACTCTCGTG	CTCAGAGTCTTGGACTGTGCG
	78.98		PRHA / <i>DdeI</i>	CTTGTTTCGCACTGCTCCACC	GCGGAAGAAGAACTCTGTTCCG
	82.27		ATMYB3R / <i>BtgI</i>	TGGTCTAGAGTTATTGACCCAT AACATG	AATTTCTGTTATCTCTGGCTAT GGAAG
	83.41	nga1139		TTTTCTTCTGTGTGCATTCC	TAGCCGGATGAGTTGGTACC
	85.75		CAT2 / <i>DdeI</i>	GACCAGTAAGAGATCCAGATAC TGCG	CACAGTCATGCGACTCAAGACTTG
	102.69		UM596A / <i>Sau96I</i>	CCCAGTCGAAATGGCCTCCG	CAGGACTTCGAGTGACGATCG
	(16389046 bp) (16709683 bp)		JM142 / <i>AluI</i>	GGCGAGGAAGACGGTGAAG	GATGGGGTGATGGTGATGC
	104.73	nga1107		CGACGAATCGACAGAATTAGG	GCGAAAAACAAAAAATCCA
	105.66		CCR1 / <i>HpaII</i>	CGTCCATCGAGCTCTTTACC	AGGCTGCGTCTTATCACCTC
	108.54		DHS / <i>BsaAI</i>	AGAGAGAATGAGAAATGGAGG	CAAGTGACCTGAAGAGTATCG
V	14.31	nga225		TCTCCCCACTAGTTTTGTGTCC	GAAATCCAAATCCCAGAGAGG
	18.35		ASA1 / <i>BclIII</i>	CCTCTAGCCTGAATAACAGAAC	CTTACTCTGTCTTGCTTAC
	50.48	nga139		GGTTTCGTTTCACTATCCAGG	AGAGCTACCAGATCCGATGG
	68.4	nga76		AGGCATGGGAGACATTTACG	GGAGAAAATGTCACTCTCCACC
	89.51		DFR.1 / <i>BsaAI</i>	TGTTACATGGCTTCATACCA	AGATCCTGAGGTGAGTTTTTC
	116.88		LFY3 / <i>RsaI</i>	GACGGCGTCTAGAAGATTC	TAACTTATCGGGCTTCTGC

^a Markers displaying polymorphism between Col-0 and S96 are bold and underlined.

Table III-4. Map position of the *SSBI* locus

Chromosome	Marker	Number of F ₂ plants examined	Segregation			Percentage recombination (mean ± SD) ^a
			Severe	Mild	None	
I	ADH	10	2	8	0	60.0 ± 11.0
	nga280	6	2	3	1	58.3 ± 14.2
II	GPA1.1	10	4	3	3	55.0 ± 11.1
III	nga6	10	3	7	0	65.0 ± 10.7
IV	nga8	10	2	5	3	45.0 ± 11.1
	AG	10	0	0	10	0
	DHS	10	0	2	8	10 ± 6.7
V	LFY	10	5	3	2	65.0 ± 10.7
	nga225	10	5	3	2	65.0 ± 10.7

^a Calculation of the recombined frequency between *SSBI* and various markers in the F₂ plants displaying no symptoms was performed according to the method of Allard (1956): $r = \{(h + 2b) / 2n\} \times 100$, where r = recombination frequency, n = number of F₂ plants analyzed, h = number of F₂ recombinants homozygous at a flanking marker, and b = the number of recombined homozygous at a flanking marker. The standard deviations for this analysis is the square root of $p(100 - p) / 2n$.

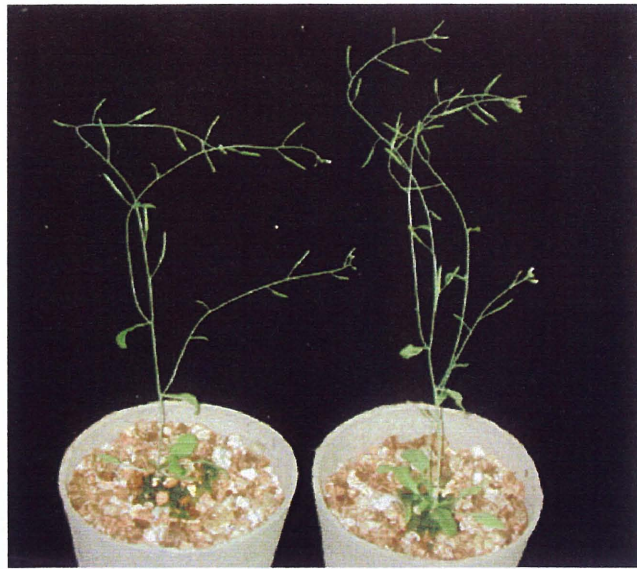
A**B****C**

Fig. III-1. Symptom phenotypes of *Arabidopsis* accessions. Plants were inoculated with SBLV virion, and photographed at 14 dpi. Representative symptoms of Col-0 (A), S96 (B) and Ei-2 (C) are demonstrated. Healthy and SBLV-infected plants are shown at left and right, respectively, in each panel.

S96

F₁ (S96 × Col-0)

Col-0



Fig. III-2. Symptom phenotype of an F1 plant from the cross between S96 and Col-0. Plants were inoculated with SBLV virion, and photographed at 14 dpi. Middle: F1 (♀ S96 × ♂ Col-0) plant infected with SBLV. Right and Left: Parental S96 and Col-0 infected with SBLV, respectively.

Fig. 1. S. Plants were inoculated with virion RNA of SBLV, and harvested at 2, 4 and 7 dpi. Whole plant tissues were pressed onto chromatography papers, and SBLV CP was immunologically detected. Arrowheads indicate inoculated leaves.

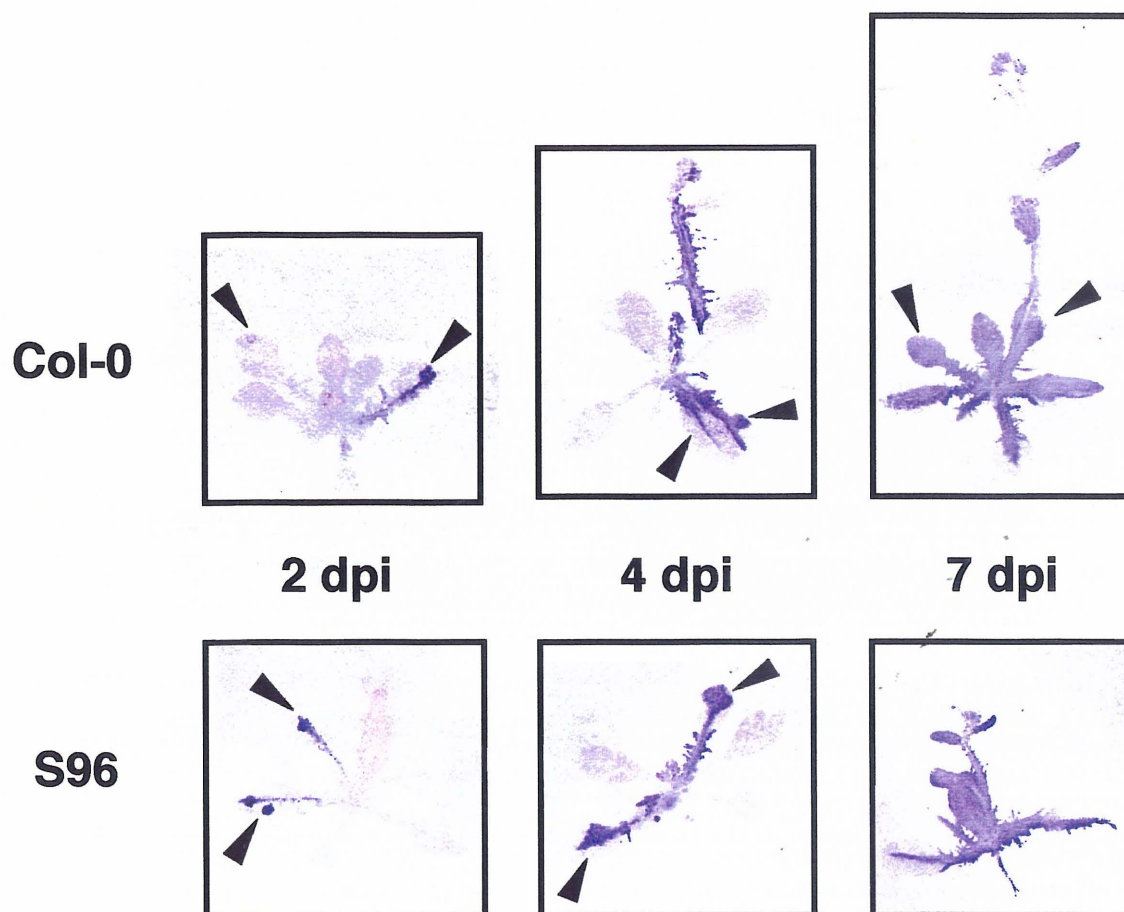


Fig. III-3. Time-course for localization of SBLV CP in Col-0 and S96. Plants were inoculated with virion RNA of SBLV, and harvested at 2, 4 and 7 dpi. Whole plant tissues were pressed onto chromatography papers, and SBLV CP was immunologically detected. Arrowheads indicate inoculated leaves.

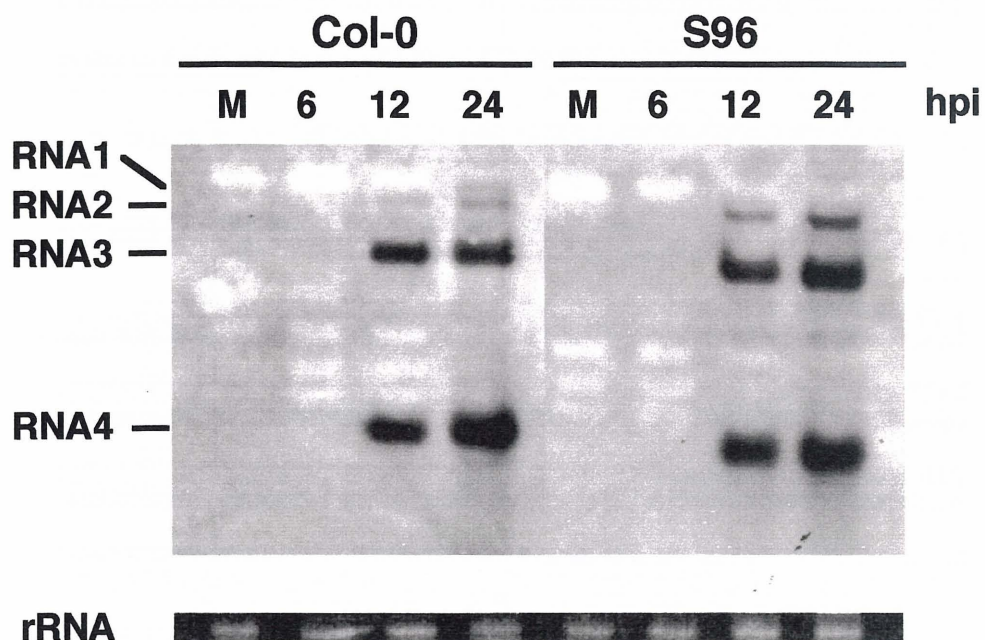


Fig. III-4. Accumulation of SBLV RNA in Col-0 and S96 protoplasts. Protoplasts were inoculated with virion RNA of SBLV, and total RNA was extracted at 6, 12 and 24 hpi. Accumulation of SBLV RNA was detected by northern blot analysis. Total RNA from mock-inoculated protoplasts was also loaded, and is indicated by M. Positions of SBLV RNAs 1, 2, 3 and 4 are indicated at left. Ethidium bromide-stained ribosomal RNA is shown below each lane.

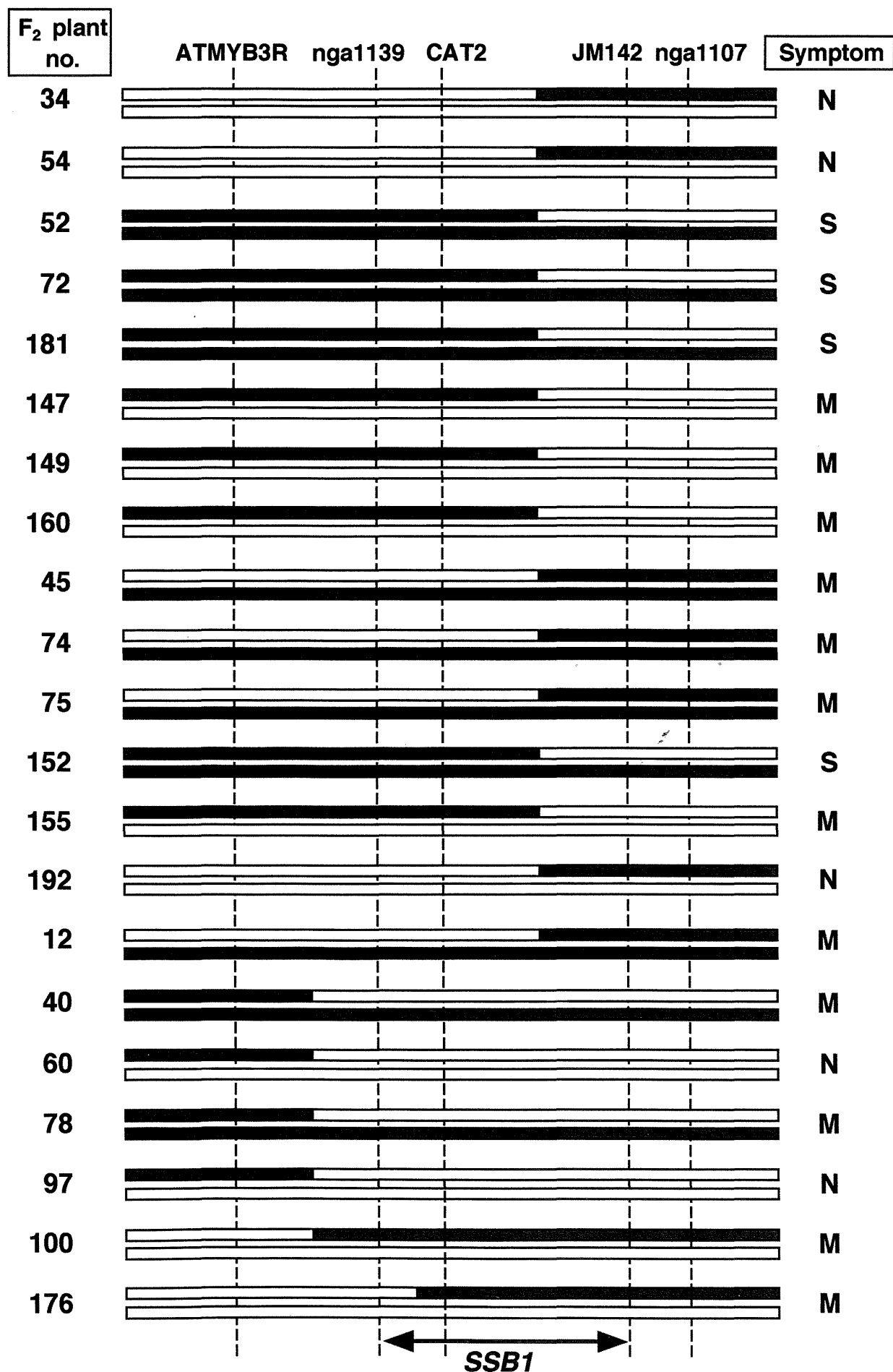


Fig. III-5. Symptom phenotypes in SBLV infection and recombination sites of F₂ plants (Col-0 × S96) which recombined between molecular markers ATMYB3R and nga1107. Black and white bars indicate S96 and Col-0 chromatids, respectively. S=severe symptom, M= mild symptom, N= No symptom.

引用文献

Allard, R. W. (1956). Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia* **24**, 235-278.

Allison, R. F., Janda, M., and Ahlquist, P. (1988). Infectious *in vitro* transcripts from cowpea chlorotic mottle virus cDNA clones and exchange of individual RNA components with brome mosaic virus. *J. Virol.* **62**, 3581-3588.

Carette, J. E., Verver, J., Martens, J., Van Kampem, T., Wellink, J., and van Kammen, A. (2002). Characterization of plant proteins that interact with cowpea mosaic virus '60K' protein in the yeast two-hybrid system. *J. Gen. Virol.* **83**, 885-893.

Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, A. K., and Schaad, M. C. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* **8**, 1669-1681.

Chisholm, S. T., Mahajan, S. K., Whitham, S. A., Yamamoto, M. L., and Carrington, J. C. (2000). Cloning of the *Arabidopsis* *RTM1* gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 489-494.

Chisholm, S. T., Parra, M. A., Anderbrerg, R. J., and Carrington, J. C. (2001). *Arabidopsis* *RTM1* and *RTM2* genes function in Phloem to Restrict Long-Distance Movement of Tobacco Etch Virus. *Plant Physiol.* **127**, 1667-1675.

Cooley, M. B., Pathirana, S., Wu, H. J., Kachroo, P., and Klessig, D. F. (2000). Members of the *Arabidopsis* *HRT/RPP8* family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *Plant Cell* **12**, 663-676.

Dardick, C. D., Golem, S., and Culver, J. N. (2000). Susceptibility and symptom development in *Arabidopsis thaliana* to tobacco mosaic virus is influenced by virus cell-to-cell movement. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 1139-1144.

Dempsey, D. A., Pathirana, M. S., Wobbe, K. K., and Klessig, D. F. (1997). Identification of an *Arabidopsis* locus Required for resistance to turnip crinkle virus. *Plant J.* **11**, 301-311.

Dempsey, D. A., Wobbe, K. K., and Klessig, D. F. (1993). Resistance and susceptible

responses of *Arabidopsis thaliana* to turnip crinkle virus. *Phytopathology* **83**, 1021-1029.

Dhingra, O., and Surridge, C. (1985). Basic Plant Pathology methods. CRC Press. Boca. 317.

Diez, J., Ishikawa, M., Kaido, M., Ahlquist, P. (2000). Identification and characterization of a host protein required for efficient template selection in viral RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3913-3918.

Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S., and Robaglia, C. (2002). The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J.* **32**, 927-934.

Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* **19**, 1349.

Fujisaki, K., Hagihara, F., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. (2003a). Complete nucleotide sequence of spring beauty latent virus, a bromovirus infectious to *Arabidopsis thaliana*. *Arch. Virol.* **148**, 165-175.

Fujisaki, K., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. (2003b). Use of *Spring beauty latent virus* to identify compatible interactions between bromovirus components required for virus infection. *J. Gen. Virol.* in press.

Fujita, M., Mise, K., and Furusawa, I. (1999). Expression and characterization of the 3a movement protein of cowpea chlorotic mottle bromovirus. *Arch. Virol.* **144**, 2449-2456.

Fujita, M., Mise, K., Kajiura, Y., Dohi, K., and Furusawa, I. (1998). Nucleic acid-binding properties and subcellular localization of the 3a protein of brome mosaic bromovirus. *J. Gen. Virol.* **79**, 1273-1280.

Glazebrook, J. (2001). Genes controlling expression of defense responses in -2001 status. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 301-308.

Ishikawa, M., Diez, J., Restrepo-Hartwig, M., and Ahlquist, P. (1997). Yeast mutations in multiple complementation groups inhibit brome mosaic virus RNA replication and

transcription and perturb regulated expression of the viral polymerase-like gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13810-13815.

Ishikawa, M., Naito, S., and Ohno, T. (1993). Effects of the *tom1* mutation of *Arabidopsis thaliana* on the multiplication of tobacco mosaic virus RNA in protoplasts. *J. Virol.* **67**, 5328-5338.

Ishikawa, M., Obata, F., Kumagai, T., and Ohno, T. (1991). Isolation of mutants of *Arabidopsis thaliana* in which accumulation of tobacco mosaic virus coat protein is reduced to low levels. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 33-38.

Janda, M., French, R., and Ahlquist, P. (1987). High efficiency T7 polymerase synthesis of infectious RNA from cloned brome mosaic virus cDNA and effects of 5' extensions on transcript infectivity. *Virology* **158**, 259-262.

Kato, T., Uehara, M., Satou, M. et al. (1999). Positional cloning of *SGR* genes in *Arabidopsis* by the FIRE (Fast Isolation of Recombinants) strategy. *Plant Cell Physiol.* suppl. 40: s13.

Kroner, P., and Ahlquist, P. (1992). RNA based viruses. In "Molecular Plant Pathology: A Practical Approach" (S. J. Gurr, M. J. McPherson, and D. J. Bowles, eds.), Vol. 1, pp. 23-34. IRL Press, Oxford.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lartey, R. T., Ghoshroy, S., and Citovsky, V. (1998). Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutation (*vsm1*) that restricts systemic movement of tobamoviruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 706-709.

Lee, J. M., Hartman, G. L., Domier, L. L., and Bent, A. F. (1996). Identification and map location of *TTR1*, a single locus in *Arabidopsis thaliana* that confers tolerance to tobacco ringspot nepovirus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 729-735.

Lee, S., Stenger, D. C., Bisaro, D. M., and Davis, K. (1994). Identification of loci in *Arabidopsis* that confer resistance to geminivirus infection. *Plant J.* **6**, 525-535.

Lee, W. M., Ishikawa, M., and Ahlquist, P. (2001). Mutation of Host $\Delta 9$ fatty acid

desaturase inhibits brome mosaic virus RNA replication between template recognition and RNA synthesis. *J. Virol.* **75**, 2097-2106.

Leisner, S. M., and Howell, S. H. (1992). Symptom variation in different *Arabidopsis thaliana* ecotypes produced by cauliflower mosaic virus. *Phytopathology* **82**, 1042-1046.

Leisner, S. M., Turgeon, R., and Howell, S. H. (1993). Effects of host plant development and genetic determinants on the long-distance movement of cauliflower mosaic virus in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**, 191-202.

Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A., and Carrington, J. C. (2002). Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr. Biol.* **12**, 1046-1051.

Lin, B., and Heaton, L. A. (2001). An *Arabidopsis thaliana* protein interacts with a movement protein of Turnip crinkle virus in yeast cells and *in vitro*. *J. Gen. Virol.* **82**, 1245-1251.

Mahajan, S. K., Chisholm, S. T., Whitham, S. A., and Carrington, J. C. (1998). Identification and characterization of a locus (*RTM1*) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **14**, 177-186.

Matsushita, Y., Miyakawa, O., Deguchi, M., Nishiguchi, M., and Nyunoya, H. (2002). Cloning of a tobacco cDNA coding for a putative transcriptional coactivator MBF1 that interacts with the tomato mosaic virus movement protein. *J. Exp. Bot.* **53**, 1531-1532.

Mise, K., and Ahlquist, P. (1995). Host-specificity restriction by bromovirus cell-to-cell movement protein occurs after initial cell-to-cell spread of infection in nonhost plants. *Virology* **206**, 276-286.

Nagano, H., Mise, K., Okuno, T., and Furusawa, I. (1999). The cognate coat protein is required for cell-to-cell movement of a chimeric brome mosaic virus mediated by the cucumber mosaic virus movement protein. *Virology* **265**, 226-234.

Noueiry, A. O., Chen, J., and Ahlquist, P. (2000). A mutant allele of essential, general translation initiation factor *DED1* selectively inhibits translation of a viral m RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12985-12990.

Ohshima, K., Taniyama, T., Yamanaka, T., Ishikawa, M., and Naito, S. (1998). Isolation of a mutant of *Arabidopsis thaliana* carrying two simultaneous mutations affecting tobacco mosaic virus multiplication within a single cell. *Virology* **243**, 472-481.

Okinaka, Y., Mise, K., Okuno, T., and Furusawa, I. (2003). Characterization of a natural barley protein, HCP1, that interacts with the *Brome mosaic virus* coat protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* in press.

Quadt, R., Kao, C. C., Browning, K. S., Hershberger, R. P., and Ahlquist, P. (1993). Characterization of a host protein associated with brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1498-1502.

Ruffel, S., Dussault, M-H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., and Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* **32**, 1067-1075.

Schmitz, I., and Rao, A. L. N. (1996). Molecular studies on bromovirus capsid protein. I. Characterization of cell-to-cell movement-defective RNA3 variants of brome mosaic virus. *Virology* **226**, 281-293.

佐藤修正・田畑哲之 (2001). モデル植物シロイヌナズナのゲノム塩基配列決定. 蛋白質 核酸 酵素 **46**, 61-65.

Séron, K., and Haenni, A-L. (1996). Vascular movement of plant viruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 435-442.

Takahashi, H., Goto, N., and Ehara, Y. (1994). Hypersensitive response in cucumber mosaic virus-inoculated *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **6**, 369-377.

Takahashi, H., Miller, J., Nozaki, Y., Sukamoto, Takeda, M., Shah, J., Hase, S., Ikegami, M., Ehara, Y., and Dinesh-Kumar, S. P. (2002). *RCYL*, an *Arabidopsis thaliana* *RPP8/HRT* family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant J.* **32**, 655-667.

Takahashi, H., Suzuki, M., Natsuaki, K., Shigyo, T., Hino, K., Teraoka, T., Hosokawa, D., and Ehara, Y. (2001). Mapping the virus and host genes involved in the resistance response in cucumber mosaic virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 340-347.

Takeuchi, S., Hikichi, Y., Kawada, Y., and Okuno, T. (1999). Direct immunostaining assay, a new simplified technique for detection of tobamoviruses from seeds of green pepper (*Capsicum annuum* L.). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **65**, 189-191.

Tsujimoto, Y., Numaga, T., Ohshima, K., Yano, M., Ohsawa, R., Goto, D. B., Naito, S., and Ishikawa, M. (2003). *Arabidopsis* TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION (TOM) 2 locus encodes a transmembrane protein that interacts with TOM1. *EMBO J.* **22**, 335-343.

Valverde, R. A. (1985). Spring beauty latent bromovirus: A new member of the bromovirus group. *Phytopathology* **75**, 395-398.

Whitham, S. A., Anderberg, R. J., Chisholm, S. T., and Carrington J. C. (2000). *Arabidopsis* RTM2 gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell* **12**, 569-582.

Xie, Q., Sanz-Burgos, A. P., Guo, H., Garcia, J. A., and Gutierrez C. (1999). GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Mol. Biol.* **39**, 647-56.

Yamanaka, T., Imai, T., Sato, R., Kawashima, A., Takahashi, M., Tomita, K., Kubota, K., Meshi, T., Naito, S., and Ishikawa, M. (2002). Complete inhibition of tobamovirus multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes. *J. Virol.* **76**, 2491-2497.

Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M., Meshi, T., Schmidt, R., Dean, C., Naito, S., and Ishikawa, M. (2000). *TOM1*, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10107-10112.

Yoshii, M., Yoshioka, N., Ishikawa, M., and Naito, S. (1998a). Isolation of an *Arabidopsis thaliana* mutant in which accumulation of cucumber mosaic virus coat protein is delayed. *Plant J.* **13**, 211-219.

Yoshii, M., Yoshioka, N., Ishikawa, M., and Naito, S. (1998b). Isolation of an *Arabidopsis thaliana* mutant in which the multiplication of both cucumber mosaic virus and turnip crinkle virus is affected. *J. Virol.* **72**, 8731-8737.

摘 要

植物ウイルスが宿主植物に全身感染する際には、ウイルス側の因子と共に宿主側の因子が重要な役割を果たしている。しかし、宿主因子に関する知見はほとんど得られていないのが現状である。このような中、近年では *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) などのモデル生物を用いて、宿主因子の分子遺伝学的解析が精力的に行われてきている。*Spring beauty latent virus* (SBLV) は *Bromovirus* 属に分類される植物 RNA ウイルスであり、近年シロイヌナズナのアクセション Columbia-0 (以下 Col-0) に効率良く全身感染することが明らかになった。そこで本研究では、シロイヌナズナを用いた遺伝学的手法により、SBLV の増殖に関与する宿主因子遺伝子の単離・同定を試み、宿主因子に関する新たな知見を得ることを目指した。

第 1 章

SBLV の感染が阻害された Col-0 変異株を選抜し、原因遺伝子を探索することにより SBLV の増殖に必要な宿主因子の単離・同定を目指した。エチルメタンスルホン酸により突然変異誘起処理した Col-0 の種子由来の M2 植物 2,231 個体に SBLV を接種し、その感染性を調査したところ、SBLV 感染が遅延する変異株が 1 ライン (2433B) 選抜された。2433B における SBLV 感染の遅延は、接種葉の段階から認められた。しかし、1 細胞レベルにおける増殖は野生型 Col-0 と同程度であった。このことから、2433B における SBLV 感染の遅延は細胞間移行のレベルで決定されていると考えられた。また、遺伝学的解析の結果、2433B における SBLV 感染の遅延は、劣性の形質によって支配されることが示された。

第 2 章

SBLV 感染に関与する宿主因子を単離するために、67 種類のアクセションにおける SBLV の感染性を調査した。その結果、ほとんどのアクセションは Col-0 と同様に SBLV に効率良く全身感染したが、Pla-0 では SBLV 感染が遅延することが明らかとなった。Pla-0 における SBLV 感染の遅延は接種葉においても認められた。しかし 1 細胞レベルにおけるウイルス増殖は Col-0 と同程度であった。このことから、Pla-0 における SBLV 感染の遅延は細胞間移行のレベルで決定されていると考えられた。また、遺伝学的解析の結果、Pla-0 における SBLV 感染の遅延は、劣性あるいは不完全優性の形質によって支配されることが示された。

第3章

SBLV はシロイヌナズナに感染しても、Col-0 などほとんどのアクセッションにおいて無病徴の潜在感染をする。しかし、85 種類のアクセッションにおける SBLV の病徴を観察したところ、S96、Fr-2、Ei-2、Abd-0 の 4 つのアクセッションが病徴を発現することが明らかになった。SBLV に感染した S96 では、接種葉や非接種ロゼッタ葉に黄化やえ死が見られ、花茎組織の形成も阻害された。遺伝学的解析の結果、S96 における病徴発現に関与する不完全優性の核内単一遺伝子座、*SSB1* (Symptom development in SBLV infection) が同定された。さらにマッピング解析の結果、*SSB1* は第4染色体長腕上に位置することが明らかになった。S96 における SBLV の感染性を調査したところ、1 細胞レベルにおける SBLV 増殖能や、植物体における SBLV の移行能は Col-0 で同程度であった。このことから、*SSB1* は SBLV の複製や細胞間移行、長距離移行といった感染過程には関与せず、病徴発現に関わると考えられた。